Modulation des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber durch alimentäres Selen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Rudolf Reiter
aus Schweinfurt

1984

UNIV.
OREGON
LIBR.

MODULATION DES FREMDSTOFFWECHSELS DER MÄUSELEBER DURCH ALIMENTÄRES SELEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Rudolf Reiter
aus Schweinfurt

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 2o.2.1984

Dekan: Prof. Dr. Joachim Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Albrecht Wendel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Mecke

Reiter, Rudolf

MODULATION DES FREMDSTOFFWECHSELS DER MÄUSELEBER DURCH ALIMENTÄRES SELEN

Männliche Albinomäuse wurden mit Diäten unterschiedlichen Selengehalts (≤1o ppb–1o ppm Selen) gefüttert. Im Bereich zwischen 5o ppb und 1 ppm Selen besteht ein logarithmischer Zusammenhang zwischen dem Selengehalt der Nahrung und der Aktivität der selenabhängigen Glutathionperoxidase (Se-GSH-Px). Änderungen im Fremdstoffwechsel traten nur im Selenmangel und unter Vergiftungsbedingungen auf. Im Vergleich zu Kontrolltieren (o.5 ppm Selen) führt die Verfütterung von 1o ppm Selen zu einer 24%igen Verringerung des mikrosomalen Cytochromgehalts. Daneben tritt ein 1oo %iger Anstieg der GSH-S-Transferasen Aktivität gegenüber Ethacrynsäure und der nicht-selenabhängigen Glutathionperoxidase (non-Se-GSH-Px) Aktivität (18o%) ein. Nach 6monatigem Selenmangel sinkt der Selengehalt der Mäuseleber auf unter 1o % und Se-GSH-Px Aktivität auf 1.3% der Kontrolle ab. Andere Schutzsysteme gegen Lipidperoxidation sind im Selenmangel nicht signifikant verändert. Zahlreiche spezifische Enzymaktivitäten, nicht aber der Cytochromgehalt sind in den Lebermikrosomen beider Gruppen verschieden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist die NADPH-Cytochrom c Reduktase um 35 % und die Flavin-haltige Monooxygenase um 5o% erniedrigt, während die Geschwindigkeit der Äthoxycumarin-O-Deäthylierung (34o%), der Cytochrom-P45o-Hydroperoxidase (184 %), Hämoxygenase (22o%) und der UDP-Glukuronyltransferase (212 %) Aktivität unter Selenmangelbedingungen drastisch erhöht ist. Unter den erfaßten PhaseII Reaktionen führt progressiver Selenmangel im Vergleich zur Kontrolle zu einer verringerten Sulfatierungsgeschwindigkeit (56%) und dem Anstieg der GSH-S-Transferasen Aktivität gegenüber 1.2-Dichloro- 4- nitrobenzol (31o %) und 1-Chloro- 2.4- dinitrobenzol (25o %). 5o ppb Selen sind in allen Fällen ausreichend, um diese Änderungen im Fremdstoffwechsel quantitativ aufzuheben. Der Depletionsprozeß kann in drei Phasen aufgelöst werden: Der schnelle anfängliche Abfall der Se-GSH-Px Aktivität gegenüber der Kontrolle erfolgt mit einer Halbwertszeit von 74 Stunden und ist nach 14 Tagen abgeschlossen. Ein geringer Anstieg der GSH-S-Transferasen-(12o %) und der Cytochrom-P45o Hydroperoxidase (12o %) Aktivität wird um den 17.–21. Tag der Depletion von synchron verlaufenden Auslenkungen von Phase I und II Enzymaktivitäten gefolgt, die nach weiteren 5 Wochen abgeschlossen sind. Nach 4 Monaten werden signifikante Gewichtsunterschiede zwischen beiden Gruppen meßbar. Diese Auslenkung des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber und der Verlust der Se-GSH-Px Aktivität im Selenmangel sind reversibel. Eine Rückkehr zu den Kontrollaktivitäten nach Gabe von 25o µg Selen/kg erfolgt mit individuellen Zeitkonstanten. Eine halbmaximale Aufhebung der Änderungen im Fremdstoffwechsel der Leber von Selenmangelmäusen erfolgt uniform bei einer Dosis von 7 µg Selen/kg. Eine Induktion der Se-GSH-Px Aktivität wird erst oberhalb 1o–15 µg Selen/kg beobachtet. Die Modulation des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber wird auf der Grundlage eines Se-GSH-Px unabhängigen Regulators diskutiert, der in den Protein Turnover von Enzymen eingreift.

UNIV. LIBRARY

Die vorliegende Dissertation wurde auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. A.Wendel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität (Direktor:Prof.Dr. D.Mecke) zu Tübingen angefertigt.

Teile der Dissertation wurden bereits auszugsweise veröffentlicht:

- A.Wendel,R.Reiter,Internat. Congress on Oxygen Radicals (ICOR), München 1983 (abstract)
- R.Reiter,A.Wendel,Hoppe Seylers Z. Physiolog. Chem. 364 (1983), 359 (abstract)
- R.Reiter,A.Wendel,Biochem. Pharmacol. 32 (1983),3o63

Herrn Prof. Wendel bin ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und sein Interesse zu Dank verpflichtet,ebenso Herrn Prof. Mecke in seiner Eigenschaft als Institutsdirektor und Gutachter dieser Arbeit. Auch im Namen von Prof. Wendel möchte ich ferner Dr. Weiser (Hoffmann-La Roche AG,Basel) für die Überlassung von Vitamin E Mangelratten und Prof. W. B. Jacoby (NIH, Bethesda) für die Bereitstellung von Antikörpern gegen GSH-S-Transferasen Isoenzyme der Ratte danken.
Mein besonderer Dank gilt den Prof. R.F. Burk und C.K. Chow für kritische Diskussionen und interessante Anregungen, ferner Cand. biochem. R. Otter für seine Mithilfe bei praktischen Arbeiten. Ebenso muß ich mich für ein Stipendium der Studienstiftung an dieser Stelle bedanken. Zuletzt, wenngleich nicht weniger möchte ich all jenen danken, die ungenannt blieben,doch ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre oder sich erheblich schwieriger gestaltet hätte.

INHALTSVERZEICHNIS:

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Geschichtliche Entwicklung	1
1.2.	Stoffwechselfunktionen von Selen in Wirbeltieren	3
1.2.1.	Das Antioxidans Modell von Selen:Glutathionperoxidase	3
1.2.2.	Die Bedeutung von Selen für weitere Stoffwechselaktivitäten	8
2.	PROBLEMSTELLUNG	10
3.	MATERIALIEN UND METHODEN	11
3.1.	Materialien	11
3.1.1.	Chemikalien	11
3.1.2.	Gase	11
3.1.3.	Materialien für die Chromatographie	11
3.1.4.	Geräte	12
3.1.5.	Tierfutter	12
3.2.	Methoden	13
3.2.1.	Tierhaltung	13
3.2.2.	Aufarbeitung des biologischen Materials	13
3.2.3.	Biochemische Analytik	14
3.2.4.	Spurenelementbestimmungen	15
3.2.5.	Fettsäureanalyse	15
3.2.6.	Statistische Bewertung der Versuchsergebnisse	17
4.	ERGEBNISSE	18
4.1.	Rahmenbedingungen	18
4.1.1.	Die Bestimmung des Selenstatus der Mäuseleber	18
4.1.2.	Diätetische Voraussetzungen	19
4.2.	Die Abhängigkeit des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber von alimentärem Selen	21
4.3.	Der Antioxidansstatus von Selenmangelmäusen	24
4.4.	Der zeitliche Verlauf der Selendepletion	26
4.5.	Repletionsstudien	27

5. DISKUSSION 32

5.1. Die Charakterisierung des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber 32

5.2. Praktische Konsequenzen 35

5.2.1. Die Abschätzung der Schwere des Selenmangels 35

5.2.2. Selenmangel-Tiermodelle im Rahmen pharmakologisch-toxikologischer Untersuchungen 36

5.3. Mechanistische Betrachtungen 37

5.3.1. Selenmangel und Lipidperoxidation 38

5.3.2. Stoffwechselregulation durch Selen:Eine Hypothese 39

6. LITERATUR 42

ABKÜRZUNGEN:

GSH/GSSG	reduziertes / oxidiertes Glutathion
$NADPH/NADP^+$	reduziertes / oxidiertes Nikotinamidadenosindinukleotidphosphat
NADH	reduziertes Nikotinamidadenosindinukleotid
UDP	Uridindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
Se-GSH-Px (GSH-Px)	selenhaltige Glutathionperoxidase
non-Se-GSH-Px	selenunabhängige Glutathionperoxidase
(Se^-)	Selenmangelmäuse
(Se^+)	Selen-supplementiertes Tierkollektiv
ppm	Konzentrationsangabe: parts per million
ppb	Konzentrationsangabe: parts per billion
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
i.p.	intraperitoneale Applikation

1. EINLEITUNG:

1.1. Geschichtliche Entwicklung

Selen wurde 1817 von Berzelius als eigenständiges Element identifiziert (1). Sehr früh machte man mit der schlechten Handhabbarkeit und Toxizität organischer Selenverbindungen Bekanntschaft und es ist deshalb nicht verwunderlich, daß das Hauptinteresse zunächst den vielversprechenden physikalischen Eigenschaften dieses Elements galt.

Um 1930 erregte Selen dann das erste Mal in diesem Jahrhundert wegen seiner Wechselwirkungen mit biologischen Systemen Aufsehen.In Teilen des Mittleren Westens der Vereinigten Staaten von Amerika wurde die Viehzucht mit zwei lebensbedrohenden Krankheitsbildern, der "blind stagger" und "alkali disease" konfrontiert(2).Beide Erkrankungen wurden bald mit dem hohen Selengehalt des Bodens und der Vegetation in Verbindung gebracht und als Selenvergiftungen klassifiziert (3). Doch damit nicht genug, führten Folgeuntersuchungen der "Food and Drug Administration" aufgrund einer Fehlinterpretation zur Ächtung von Selen als Karzinogen (4).

Die Metamorphose von Selen aus einem toxischen Karzinogen in ein essentielles Spurenelement wurde gegen Ende der 50er Jahre eingeleitet. Zwar war bereits 1954 Selen als ein essentieller Wachstumsfaktor für Mikroorganismen beschrieben worden (5), doch stieß diese Entdeckung zunächst nur auf geringes Interesse. Viel beeindruckender war dagegen die Schutzwirkung von Selen gegen die nahrungsbedingte Lebernekrose bei der Ratte (6) und exsudative Diathese beim Huhn (7,8). Hatte Schwarz 1949 nur die gleichzeitige Abwesenheit von Vitamin E und schwefelhaltigen Aminosäuren in der Nahrung als Voraussetzung für die Auslösung der nahrungsbedingten Lebernekrose bezeichnet(9),so mußte er nun erkennen, daß zusätzlich das Fehlen eines selenhaltigen Nahrungsbestandteils, des "Faktor 3", dazu erforderlich war. Antioxidans-Eigenschaften bilden den gemeinsamen Nenner dieser drei Nahrungsbestandteile und es ist deshalb nicht verwunderlich, daß sowohl Selen als auch Vitamin E einen wirksamen Schutz gegen

zahlreiche Degenerationserscheinungen bietet, die auf komplexen Mangelzuständen beruhen.Die sehr viel höhere Antioxidans-Aktivität von Selen im Vergleich zu den Nahrungsbestandteilen Vitamin E und Cystin deutete jedoch auf einen grundlegend verschiedenen Wirkungsmechanismus, d.h. eine katalytische Funktion von Selen hin. Ebenso zeigt die Unwirksamkeit von Selenverbindungen gegen eine Reihe typischer Vitamin E Mangelerscheinungen (1o) und die Existenz Vitamin E unabhängiger Selenmangeldefekte (12-14) eine eigenständige Rolle für Selen auf.

Der Versuch, die molekulare Basis für die Wirksamkeit von Selen durch die Isolation von "Faktor 3" aufzuklären, führte jedoch kaum zu konkreten Erfolgen und wurde schließlich durch Ereignisse überholt,die 1957 mit der Entdeckung des Enzyms "Glutathionperoxidase" durch Mills (15) begonnen hatten und 1973 mit dem Nachweis von Glutathionperoxidase als Selenoenzym ihren Höhepunkt erreichten (16).

Etwa um die gleiche Zeit wurde mit der Schutzwirkung von Selen gegen Schwermetallvergiftungen (17,18) eine andere wichtige Funktion des Elements beschrieben.

Mit dem Nachweis von Selen in Se-GSH-Px aus Human-Erythrozyten und statistischen Erhebungen über eine suboptimale Selen - versorgung des Menschen und die Häufigkeit bestimmter Krebs-(2o) oder Herzkranzgefäßerkrankungen (21) wurde das Interesse auf den Humanbereich ausgedehnt. Vor diesem Hintergrund findet zur Zeit eine heftige Diskussion über die Notwendigkeit und den Nutzen einer Supplementierung des Menschen mit Selen statt. Es gibt jedoch noch keinen Beweis für Selenmangel als die einzige, entscheidende Ursache einer Reihe von Krankheitsbildern beim Menschen mit niedrigem Selenstatus (22-25), zumal die Beteiligung anderer Umwelteinflüsse an der Krankheitsentwicklung wahrscheinlich ist.

Sicherlich sind in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt worden,jedoch darf nicht übersehen werden,daß viele Fragen immer noch offenstehen und insgesamt wenig über die Mechanismen bekannt ist,durch die Selen seine Wirkung entfaltet.

1.2. Stoffwechselfunktionen von Selen in Wirbeltieren

Selen besitzt wie viele andere Spurenelemente eine zweiseitige Wirkung auf biologische Systeme: Um essentielle metabolische Bedürfnisse zu befriedigen sind sehr niedrige Mengen des Spurenelements in der Nahrung (≤ 50 ppb) ausreichend. Wenn jedoch der Selenspiegel in der Nahrung ansteigt und einen wirksamen Konzentrationsbereich übersteigt (≥2 ppm) treten chronische oder akute Vergiftungserscheinungen (2) auf.

Der Schlüssel zum Verständnis der Essentialität von Selen liegt in den physikochemischen Eigenschaften des Elements begründet. Als ein Gruppe VI Element besitzt Selen eine Reihe dem Element Schwefel sehr ähnlicher Eigenschaften (z.B. Bindungsenergie, Ionisierungspotential, Elektronegativität, Polarisierbarkeit). Dennoch können sich beide Elemente in vivo nicht gegenseitig vertreten. Drastische Unterschiede in den Redoxeigenschaften von Selenit und Sulfit sowie den Dissoziationskonstanten von Selenohydryl- und Sulfhydrylgruppen bilden die Grundlage für hochspezialisierte Stoffwechselfunktionen von Selen. In diesen Eigenschaften ist bereits die Beteiligung von Selen an Redoxzentren von Enzymen (26-28) und als Determinator bestimmter Proteinkonformationen (29) für regulatorische oder strukturelle Zwecke vorgezeichnet, wie sie in mikrobiellen Selenoenzymen beschrieben sind.

Bei höheren Tieren ist Se-GSH-Px zur Zeit das einzige strukturell und funktionell aufgeklärte Selenoenzym, das für die Erklärung zahlreicher dem Selen zugeschriebenen Effekte herangezogen wird. Allerdings schließt dieser Zusammenhang nicht andere mögliche Funktionen von Selen aus.

1.2.1. Das Antioxidans Modell von Selen: Glutathionperoxidase

Das Ziel der Zellatmung ist die Erzeugung von ATP und Wasser aus Sauerstoff und reduzierten Coenzymen mit Hilfe der Cytochromoxidase. Die beim schrittweisen Elektronentransfer auftretenden reaktiven Sauerstoffspezies bleiben dabei fest an das Enzym gebunden. Jedoch werden beträchtliche Mengen an gefährlichen

Intermediate wie Superoxid und Wasserstoffperoxid durch andere spezifische Enzymaktivitäten und unter bestimmten Stoffwechselbedingungen gebildet. Die Gefährlichkeit dieser Spezies besteht in ihrer Fähigkeit, komplexe Reaktionen auszulösen, die unter dem Begriff "Lipidperoxidation" zusammengefaßt sind (3o). Die ungesättigten Membranlipide sind eines der bevorzugten Ziele für peroxidative Veränderungen, und die Bedeutung als möglicher Mechanismus einer Zellschädigung wird deutlich, wenn man die Rolle der Membranen als Sitz von Schlüsselenzymen verschiedener Stoffwechselwege und als Steuerelement von Metabolitungleichgewichten zwischen verschiedenen Zellkompartimenten bedenkt. Auf diese Bedrohung hat die Zelle mit der Entwicklung eines breitgefächerten Schutzsystems aus Enzymen und Antioxidansien geantwortet. Die Rolle der Se-GSH-Px in diesem integralen Schutzsystem ist heute allgemein akzeptiert und viele der dem Selen zugeschriebenen Wirkungen werden heute auf der Grundlage direkter oder indirekter Effekte durch Se-GSH-Px diskutiert.

Glutathionperoxidase wurde 1973 als Selenoenzym identifiziert und ist heute eindeutig hinsichtlich der Stöchiometrie (31) und der chemischen Form von Selen im aktiven Zentrum (32), der Aminosäuresequenz (33) und seinen kinetischen Eigenschaften (34) aufgeklärt.

Das Potential der Se-GSH-Px als Schutzmechanismus gegen peroxidative Schäden wird durch vier Beobachtungen beschrieben:

- Im Erythrozyten ist unter physiologischen Bedingungen Se-GSH-Px aufgrund seiner kinetischen Eigenschaften der Katalase im Abbau von Wasserstoffperoxid überlegen (35). Mit Ausnahme von degenerierten Zellen wie Erythrozyten erfüllen jedoch beide Enzyme die gleiche Funktion in verschiedenen Zellkompartimenten.
- Se-GSH-Px kann nicht nur Wasserstoffperoxid, sondern eine Vielzahl biologisch-relevanter Hydroperoxide (36) umsetzen. Dieser "Substratunspezifität" steht die strikte Abhängigkeit von reduziertem Glutathion gegenüber. Die Reaktion läßt sich allgemein schreiben als

$$ROOH + 2\ GSH \longrightarrow ROH + HOH + GSSG$$

- In zahlreichen Fällen, in denen oxidativer Stress durch die Anwesenheit von Prooxidantien (37,54) oder Antioxidanzmangel(6o) gefördert ist,tritt eine Induktion der Se-GSH-Px Aktivität ein.
- Der Verlust der Se-GSH-Px Aktivität und die Entwicklung der nahrungsbedingten Lebernekrose verlaufen parallel und in zahlreichen Fällen führt Selenmangel zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Formen chemisch-induzierter Gewebeschäden (38-46).

Die Frage nach der Bedeutung der Se-GSH-Px in Relation zu anderen Schutzsystemen oder anders ausgedrückt der Essentialität des Schutzes durch Se-GSH-Px für die Zelle können diese Ausführungen nicht beantworten.Die Komplexität dieser Frage wird offensichtlich, wenn man die Entdeckung neuer Schutzfaktoren gegen Radikalkettenreaktionen berücksichtigt (47 - 5o,52). In Ab -

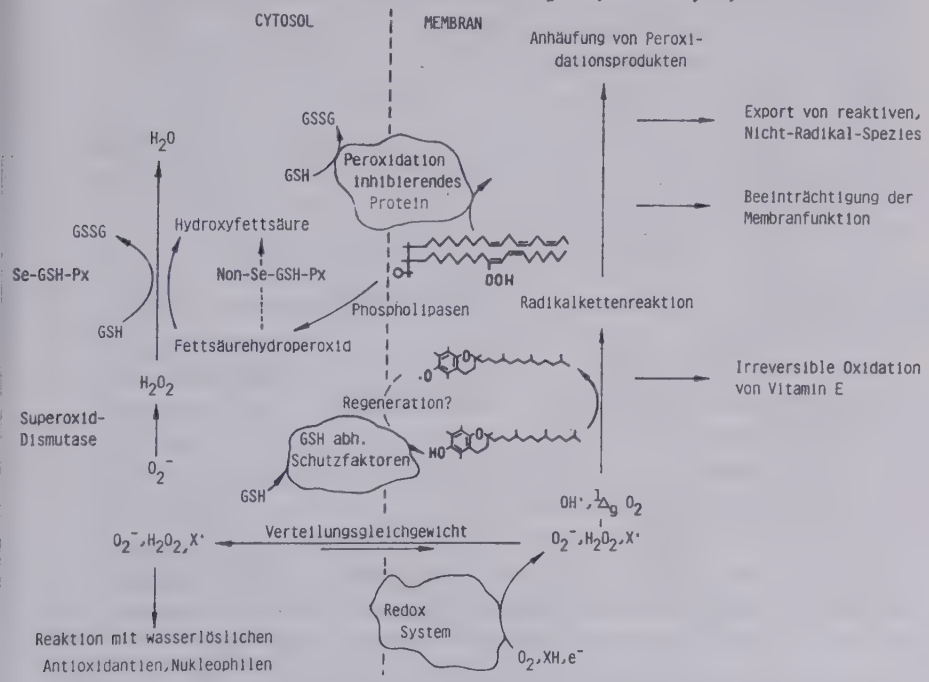

Abbildung 1: Schutzmechanismen gegen Lipidperoxidation ohne Berücksichtigung der Peroxisomen

bildung 1 ist der jetzige Wissensstand über das zelluläre Netzwerk von Schutzmechanismen skizziert, wenngleich kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben wird. Bemerkenswert ist jedoch, daß mehrere Systeme über gemeinsame Kosubstrate gekoppelt sind und die Zelle häufig mehrere Mechanismen zur Verfügung hat, um auf der gleichen Reaktionsebene mit hoher Wirksamkeit einzugreifen. Bezogen auf Se-GSH-Px bedeutet dies einerseits, daß ihre Aktivität durch Wechselwirkungen mit anderen Mechanismen z.B. mit Phospholipasen(51) - die peroxidierte Lipide in Form von Hydroxyfettsäuren erst dem Abbau durch Se-GSH-Px zugängig machen - oder über das für viele Schutzfaktoren gemeinsame Kosubstrat , Glutathion (GSH) kontrolliert wird. Andererseits kann Se-GSH-Px im Rahmen des Peroxidstoffwechsels - nicht jedoch in der Entfernung von Wasserstoffperoxid - durch Isoenzyme der GSH-S-Transferasen ersetzt werden, die "nicht-Selen-abhängige Glutathionperoxidase" (non-Se-GSH-Px) Aktivität besitzen (52).Eine weitere Alternative stellt in diesem Zusammenhang ein "Peroxidation inhibierendes Protein" (PIP) dar, das in den Membrankompartimenten verschiedener Gewebe beschrieben wurde und offenbar direkten Zugriff auf peroxidierte Lipide besitzt (5o,53). Sicherlich haben diese Punkte zu einer Relativierung des Se-GSH-Px Konzeptes geführt. Doch widerspricht dies nicht der Schutzfunktion der Se-GSH-Px, da die verschiedenen Schutzsysteme in vivo nicht in Konkurrenz zu einander treten,sondern zusammenarbeiten.

Die starke Abhängigkeit von Schwankungen im nahrungsbedingten Spurenelementangebot hebt Se-GSH-Px jedoch deutlich von anderen Spurenelement-haltigen Schutzenzymen wie Katalase und Superoxiddismutase ab (56). Die Schutzwirkung steigt allerdings nicht proportional dem Se-GSH-Px Gehalt der Zelle an. So wird diskutiert, daß andere Faktoren als Se-GSH-Px für die Schutzwirkung limitierend werden,funktionell verschiedene Se-GSH-Px Pools mit spezifischen Steuerfunktionen(57-59) existieren oder Se-GSH-Px als ein zellulärer Selenspeicher fungieren könnte (65).

1.2.2. Die Bedeutung von Selen für weitere Stoffwechselaktivitäten

Hinweise darauf, daß Se-GSH-Px nicht der einzige Ausdruck der biologischen Aktivitäten von Selen in höheren Tieren darstellt, lieferten Bilanzstudien. Sie zeigten, daß das Selen in Se-GSH-Px nur einen Bruchteil des Gesamtselengehaltes verschiedener Gewebe oder Zellorganellen ausmacht (61,62).

Die Suche nach weiteren Funktionen von Selen beschritt dabei zwei Wege: die Isolierung von Proteinen, die selektiv Selen einbauen und der Nachweis selenabhängiger Stoffwechselwege. Beide Ansätze treffen auf spezifische Probleme: einerseits kann bei Verwendung supraphysiologischer 75-Se-Dosen eine unspezifische Markierung schwefelhaltiger Proteine durch den Einbau von selenhaltigen Cystein- oder Methioninanalogen unter Funktionsverlust eintreten oder eine Denaturierung im Verlaufe der Isolierung erfolgen. Andererseits stellt sich die Frage der Abschätzung der Schwere des Selenmangels, möglicher Komplikationen durch andere Nahrungsbestandteile oder von Fehlinterpretation infolge von Sekundärläsionen. Dennoch zeichnen sich in beiden Bereichen Erfolge ab, wenngleich mit Ausnahme der Se-GSH-Px und eines funktionell verwandten Proteins (C.Gregolin, ICOR, München 1983) keine

Protein	Molekulargewicht	Spezies	Literatur
Glutathion-Peroxidase	95.000-78.000	zahlreiche Arten	63
"Peroxidation inhibiting protein"	20.000	Schwein	mündl.Mittl.
^{75}Se-P	83.000-79.000	Ratte	65
Plasma-Selenoprotein	49.000 (UE)	Ratte	66,67,68
Selenoflagellin	17.000-15.000	Ratte	69,70
Muskel-Selenoprotein	10.000	Schaf	71
Selen-bindende Proteine	17.000	Ratte	72
	68.000		

UE = Untereinheit

Tabelle 1: Selenoproteine von Wirbeltieren

Struktur-Funktionsbeziehungen zwischen Selenoproteinen und Stoffwechseländerungen bekannt sind. Eine Charakterisierung der bisher bekannten Selenoproteine (siehe Tabelle 1) ist meist auf den Einbau des Isotops 75-Se und die Bestimmung des Molekulargewichts begrenzt.

Umgekehrt haben Untersuchungen an Selenmangel-Tiermodellen eine Fülle von Informationen über die Wechselwirkungen von Selen mit Stoffwechselwegen geliefert, die in Tabelle 2 zusammengefaßt sind. Heute sind eine Reihe spezies- und organspezifischer, pathologisch definierter Struktur- und Funktionsläsionen im subakuten d.h. über mehrere Generationen andauernden, weit fortgeschrittenen Selenmangel bekannt. Daneben zeichnen sich eine Reihe biochemisch-faßbarer Veränderungen im chronischen Selenmangel d.h. nach 2-4 Monaten Depletionsdauer ab, deren molekulare Basis und Stoffwechselbedeutung zur Zeit kaum abschätzbar sind.

SYSTEMISCHE DEFEKTE IM SUBAKUTEN SELENMANGEL

Pankreas:Atrophie [b]	(14)	Haarausfall [a]	(12,13)
Linse:Kataraktbildung [a]	(13)	Aspermatogenese [a,c]	(13,74)
Endothel:Degeneration [a]	(12)	Körper-,Organmasse:reduziert [a,b]	(12,13)
Überleben von WI-38 Fibroblasten [e]	(73)		

STOFFWECHSELÄNDERUNGEN IM CHRONISCHEN SELENMANGEL

1)Stoffwechselwege:					
mitochondrialer Substratumsatz [a]	▼	(117,58)	Entgiftung:Fremdstoffe [a,c]	▼,▲	(38-46)
Lipid/Vitamin E Absorption [b]	▼	(14)	Cytochrom P450 Induktion durch Phenobarbital [a,b]	▼	(79,80,87)
Stabilität von Lysosomen [d]	▼	(64)			
Entgiftung:Schwermetalle [a]	▼	(89-91)			
2)Metabolit Turnover:					
Phospholipide [a]	▲	(76)	Häm [a]	▲	(86)
Vitamin E [a]	▲	(75)	Glukose Katabolismus [a]	▲	(76)
Glutathion [a]	▲	(77)			
3)Enzymaktivitäten:					
Glutathion Peroxidase [a-e]	▼	(63)	γ-Glutamylcystein Synthetase [a]	▲	(77)
nicht-Selen-haltige GSH-Px [a,c]	▲,-	(52,83)	δ-Aminolevulinsäure Synthetase [a]	▲	(86)
Glutathion-S-Transferasen [a,c]	▲	(81,83)	δ-Aminolevulinsäure Dehydratase [a]	▲	(116)
Cytochrom-P450-monooxygenase [a]	▼,-	(78,79,116)	Hämoxygenase [a]	▲	(81,86)
Cytochrom-P450-hydroperoxidase [a]	▲,-	(84,122)	Ferrochelatase [a]	▼	(116)
UDP-Glukuronyltransferase [a,b]	▲,▼	(42,88)	Epoxidhydrolase [a]	▲	(84)

a) Ratte, b) Huhn, c) Maus, d) Lamm, e) Mensch; ▲) Anstieg, Beschleunigung; ▼) Abfall, Verminderung

Tabelle 2: Defekte und Stoffwechseländerungen im Selenmangel

Die Auswirkungen des Selenmangels auf die mitochondriale Atmung (58,118), die Stabilität von Lysosomen (64), die Lipidabsorption (14) und die Induzierbarkeit von Cytochrom-P45o (78) sind degenerativer Natur und stehen im Einklang mit dem Verlust von Se-GSH-Px und des Schutzes gegen Lipidperoxidation im Selenmangel. Ferner kann auch die erhöhte Aktivität zahlreicher Enzyme (42,52,81,83,84) und der beschleunigte Umsatz von Biomolekülen (75-77,86) auf der Grundlage eines Se-GSH-Px gesteuerten Regelkreises diskutiert werden, der im Selenmangel Schäden beschleunigt durch alternative Enzymsysteme oder eine verringerte Lebendauer kritischer Zellbestandteile korrigiert.

Allerdings unterstreichen verschiedene Untersuchungen auch die Bedeutung anderer Faktoren als Se-GSH-Px für die Bewertung von Selenmangel-Tiermodellen:

- Ultrastrukturelle Änderungen im Spermamittelteil und die erhöhte Fragilität von Spermamitochondrien im Selenmangel (64,74) stehen im Zusammenhang mit dem Verlust eines strukturellen Selenoproteins, dem Selenoflagellin (7o).
- Die Toxizität von Schwermetallverbindungen wird zum Teil mit der Beteiligung an der Auslösung von Radikalkettenreaktionen diskutiert (85). Eine Schutzwirkung durch Selen ist jedoch an bestimmte Rahmenbedingungen gebunden und erfolgt durch so unterschiedliche Prozesse wie Umverteilung des Schwermetalls, kompetitive Bindung an spezifische Proteine und die Bildung nicht-bioverfügbarer Einschlußverbindungen (89-91).
- Der Zusammenhang zwischen Selen und Se-GSH-Px hat zur Verwendung von Selenmangel-Tiermodellen als mechanistische Sonden im Rahmen von Toxizitätsuntersuchungen von Fremdstoffen geführt, für die Lipidperoxidation als Schädigungsmechanismus diskutiert wird. Allerdings führt dieses Modell nicht in allen Fällen zur erhöhten Toxizität des Fremdstoffes (45), was Zweifel an Se-GSH-Px als dem entscheidenden Determinator oder aber an Lipidperoxidation als Schädigungsmechanismus nahelegt. Ferner tritt eine Schutzwirkung von Selen in Selenmangelratten gegenüber dem Redoxcycler Diquat (92) bereits zu einem Zeitpunkt ein,

wenn Se-GSH-Px noch nicht meßbar angestiegen ist. Gleichermaßen existiert eine zeitliche Diskrepanz zwischen der schnellen reversiblen Änderung der Hämoxygenase Aktivität und der langsamen Se-GSH-Px Induktion nach Supplementierung von Selenmangelratten (81).

2. PROBLEMSTELLUNG:

Betrachtet man die beschriebenen Veränderungen im Selenmangel, so überrascht die Vielfalt der betroffenen Stoffwechselwege. Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Fremdstoffwechsel zuteil der schnell und empfindlich auf eine Fälle von Umwelteinflüssen reagiert. Die Beschäftigung mit Selen- und damit Se-GSH-Px-Modellen führte zudem zwangsweise auf die Spur von Änderungen im Gleichgewicht zwischen der Giftung und Entgiftung von Fremdstoffen.

Allerdings führt ein Literatur-Überblick zu großer Verwirrung, da eine große Heterogenität hinsichtlich Art, Stamm und Geschlecht der Tiere, der Zusammensetzung der Nahrung, ihrem Selengehalt und der Zeitdauer der Depletion sowie der gegen verschiedene Substrate gemessenenen Enzymaktivitäten besteht.

In dieser Studie wird deshalb unter kontrollierten Bedingungen ein experimenteller Selenmangel in männlichen Mäusen erzeugt und der Fremdstoffwechsel der Leber in vitro charakterisiert. Es wird der zeitliche Verlauf der Depletion untersucht, um den Selenmangel zeitlich einzugrenzen und Rückschlüsse auf die Mechanismen zu ziehen, die für die Auslenkung des Leberstoffwechsels verantwortlich sind. In diesem Rahmen wird der Versuch unternommen, mögliche Zusammenhänge mit Se-GSH-Px aufzuklären.

3. MATERIALIEN UND METHODEN:

3.1. Materialien:

3.1.1. Chemikalien

Sigma (München):

7-Äthoxycumarin, Umbelliferon, UDP - Glukuronsäure, N.N.-Dimethylanilin, Ethacrynsäure, 4-Nitrophenol, Häm , Rotenom , entfettetes Rinderserumalbumin, D,L-α-Tokopherolazetat, Superoxiddismutase , Isocitrat , Oktylamin, Fettsäuremethylesterstandards für die Gaschromatographie

Serva (Heidelberg):

Tween 8o, D-α-Tokopherol, o-Dianisidin, Riboflavin

Fluka (Buchs/Schweiz):

1.2-Dichloro-4-nitrobenzol, 1-Chloro-2.4-dinitrobenzol, Tetrame - thylenphenylendiamin, Diaminonaphthalin

Boehringer (Mannheim):

NADPH, NADP, NADH, GSH, GSSG, GSSG-Reduktase, Katalase, Cytochrom c, ATP, Isocitratdehydrogenase

EGA-Chemie (Steinheim):

Dimethylaminoantipyrin

Peroxid Chemie (Höllriegelkreuth):

tert. Butylhydroperoxid, Cumolhydroperoxid

Kodak (Heidelberg):

γ-Tokopherol

S-Sulfocystein war nicht kommerziell verfügbar und wurde nach Segel und Johnson (96) synthetisiert.

Alle anderen,nicht aufgeführten Chemikalien und die Lösungsmittel für die HPLC waren von p.a. Qualität (Merck,Darmstadt).

3.1.2. Gase

Messer-Griesheim

Kohlenmonoxid,Wasserstoff (99.999 %), Stickstoff (99.99 %), synthetische luft

3.1.3. Materialien für die Chromatographie

Bischoff Analysentechnik (Leonberg):

HPLC Säule (3.9 mm x 15 cm): Shandon ODS Hypersil (5um)

Machery und Nagel (Düren):
Fused Silica Kapillarsäule (25 m),OV 1o1 Phase

3.1.4. Geräte

Shimadzu (Düsseldorf):
UV-3oo "Double beam-Dual wavelength" Spektralphotometer, UV 21o "Split beam" Spektralphotometer

Netheler und Hinz (Hamburg):
Photometer "Eppendorf" mit Fluoreszenzansatz

Calora (Lorch):
Aminco Fluorimeter JA 74 39

Spectra Physics (Darmstadt):
Pumpenmodul 87oo , LC 871 UV-Vis Detektor, Sp 41oo Integrator-Plotter

Perkin Elmer (Bodenseewerk):
Atomabsorptionsphotometer

Erba-Science (Hofheim):
Gaschromatograph Fractovap 215o mit Temperaturprogrammer Modell 232, Flammenionisationsdetektor und automatisches Probenauftragsystem

Beckman Instruments (München):
Ultrazentrifuge L2-65B mit Festwinkelrotor Ti 5o

Vetter (Wiesloch):
Servall Superspeed Zentrifuge mit Rotor SS34

3.1.5. Tierfutter

Als Futter wurde eine selenarme Diät auf Torulahefebasis mit folgender Zusammensetzung

Torulahefe	3o.o %
Saccharose	58.5 %
Sojaöl	6.7 %
Vitaminmischung	1.o %
Mineralienmischung	3.5 %
D,L-Methionin	o.3 %

verwendet,deren Bestandteile freundlicher Weise von Prof. Dr. R. F. Burk (San Antonio/TX,USA) zur Verfügung gestellt wurden. Als Kontrolldiät diente Futter der gleichen Zusammensetzung, das mit

o.5 ppm Selen in Form von Natriumselenit supplementiert wurde. Die Diäten wurden in 1o kg Portionen angemischt und bei Raumtemperatur, die Einzelbestandteile bei +4°C gelagert. Alternativ zu diesem pulverförmigen Futter wurde auch die pelletierte selenarme und Kontrolldiät ähnlicher Zusammensetzung der Firma Altromin (Lage) verwendet.

3.2. Methoden:

3.2.1. Tierhaltung:

Männliche Albinomäuse (Stamm NMRI han) mit 7-1o g Körpergewicht vom "Zentralinstitut für Versuchstiere" (Hannover) wurden in Gruppen zu 8-1o Tieren in Macrolon® Käfigen mit Stoffwechselböden gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und bidestilliertem Wasser. Mit Ausnahme der Depletionsstudie wurden die Tiere für mindestens vier Monate mit dem jeweiligen Futter ernährt. Ein Teil der Mäuse wurde während der ersten zwei Monate der Fütterungsexperimente mit den pelletierten Diäten gefüttert und danach auf die pulverförmigen Futterarten umgesetzt, um eine Standardisierung hinsichtlich des Restselengehaltes der Nahrung und ernährungsbedingten Wechselwirkungen mit dem Fremdstoffwechsel der Leber zu gewährleisten. Nach vier Monaten Fütterung waren keine Unterschiede zu den Mäusen feststellbar, die von Anfang an mit der pulverförmigen Diät gefüttert wurden.

3.2.2. Aufarbeitung des biologischen Materials

Zu Versuchsbeginn wurden Tierkollektive aus 3-6 Mäusen beider Diätengruppen für 24 Stunden gehungert und anschließend durch Genickbruch getötet.Die Lebern wurden vor ihrer Entfernung mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Aliquots für die Glutathion-, Vitamin E- und Spurenelementanalyse wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -2o°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Zur Isolierung der subzellulären Fraktionen wurden die Lebern in o.1 Mol/Liter Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4 unter Zusatz von o.1 mMol/Liter Äthylendiamintetraazetat (EDTA),1 mMol/Liter GSH und o.1 % fettsäurefreies Rinderserumalbumin homogenisiert .

Mikrosomale und cytosolische Fraktionen wurden durch differentielle Zentrifugation (126) getrennt und die Mikrosomen in o.1 Mol/Liter Kaliumphosphatpuffer , pH 7.4 gewaschen und erneut sedimentiert. Cytosole wurden bei -2o°C bis zur Bestimmung der Enzymaktivitäten gelagert. Mikrosomen wurden routinemäßig auf ihren Cytochrom-Gehalt überprüft (97) und innerhalb 6-8 Stunden nach der Isolierung zu Stoffwechseluntersuchungen verwendet.

3.2.3. Biochemische Analytik

Die Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden ohne Modifizierung aus der Literatur übernommem und sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.Ausnahmen hierzu bilden die mikrosomalen Pyridin-

ENZYM AKTIVITÄT	MESSPRINZIP	LITERATUR
Äthoxycumarin-O-Deäthylase [b]	Fluoreszenz:460 nm	(98)
Aminopyrin-N-Demethylase [b]	Nash Reaktion: A_{412} (ε=8cm^{-1}.mM^{-1})	(99)
Anilin Hydroxylase [b]	phenolische Kupplung:A_{640}	(100)
Cytochrom-P450-Oxidase [b]	peroxidative Umsetzung von Methanol mittels Katalase: A_{412} (ε=8cm^{-1}.mM^{-1})	(101)
Cytochrom-P450-Hydroperoxidase [b]	Oxidation von TMPD: A_{610} (ε=11.6cm^{-1}.mM^{-1})	(102)
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase [b]	$A_{550-540}$ (ε=29.6cm^{-1}.mM^{-1})	(103)
NADH-Cytochrom-c-Reduktase [b]	$A_{550-540}$ (ε=29.6cm^{-1}.mM^{-1})	(104)
Flavin-haltige Monooxygenase [b]	N-Oxid-Nitrosierung:A_{420} (ε=8.2cm^{-1}.mM^{-1}) N-Demethylierung:A_{412}(ε=8.0cm^{-1}.mM^{-1})	(105)
Häm Oxygenase [b+c]	Bilirubin Bildung:A_{486} (ε=60cm^{-1}.mM^{-1})	(106,107)
UDP-Glukuronyltransferase [b]	Verbrauch von 4-Nitrophenol:A_{405} (ε=18.5cm^{-1}.mM^{-1})	(108)
GSSG-Reduktase [c]	NADPH Verbrauch:A_{366} (ε=3.4cm^{-1}.mM^{-1})	(109)
GSH-Thioltransferase [c]	NADPH-Verbrauch in Gegenwart von S-Sulfocystein	(110)
GSH-S-Transferasen [c]	Substratumsatz 1.2-Dichloro-4-Nitrobenzol:A_{345} (ε=8.5cm^{-1}.mM^{-1}) 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol:A_{340} (ε=9.6cm^{-1}.mM^{-1}) Ethacrynsäure:A_{270} (ε=5.0cm^{-1}.mM^{-1}) 1.2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propan:A_{360} (ε=0.5cm^{-1}.mM^{-1})	(111)
Sulfotransferasen [c]	Verbrauch von 4-Nitrophenol:A_{405} (ε=18.5cm^{-1}.mM^{-1})	(112)
GSH-Peroxidase [c]	gekoppelter Test:NADPH Verbrauch:A_{366} (3.4cm^{-1}.mM^{-1})	(62)
Katalase [a]	Titanylsulfat Methode:A_{410}	(113,44)
Superoxid-Dismutase [a]	Photooxidation von o-Dianisidin:A_{460}	(114)

a) Homogenat; b) Mikrosomen; c) Cytosol;

Tabelle 3: Zusammenstellung aller erfaßten Enzymaktivitäten

nukleotid-Cytochrom-c-Reduktasen, deren Aktivitäten in Gegenwart von o.1 µMol/Liter Rotenon bestimmt wurden sowie die UDP-Glukuronyltransferase, die mit o.4 % Tween 8o aktiviert wurde. Die Aktivitäten der GSH-Px, GSSG-Reduktase, GSH-Thioltransferase, Sulfotransferase und der Flavin-haltigen Monooxygenase wurde bei 37°C bestimmt. Die anderen Aktivitätsmessungen erfolgten bei 22°C. Alle Enzymaktivitäten sind auf den Proteingehalt der jeweiligen Zellfraktion bezogen, der nach Lowry et. al. (115) bestimmt wurde.

Der Gesamtglutathiongehalt (GSH +2 GSSG) der Leber wurde nach Akerboom und Sies (118) bestimmt.

Zur Vitamin E Bestimmung wurden Leberaliquots mit γ-Tokopherol als internem Standard versetzt, in Gegenwart von 2% Pyrogallol verseift (127) und anschließend mit n-Hexan extrahiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels des in Referenz 119 beschriebenen Reversed-phase-HPLC-Systems mit Detektion bei 292 nm.

3.2.4. Spurenelementbestimmungen

Leberproben wurden lyophilisiert, mit Wasserstoffperoxid und konzentrierter Salpetersäure versetzt und in Druckaufschlußgefäßen nach Tölg naßverascht (12o). Die Bestimmung der Spurenelemente Zink, Kupfer, Eisen und Mangan aus den aufgeschlossenen Proben erfolgte mittels Atomabsorptionsspektrometrie mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dipl. Biochemiker A. Gärtner. Kalzium und Magnesium wurden durch Flammenionisationsspektrometrie mit Hilfe von Herrn Dr. Schmalzing (Toxikologisches Institut) quantifiziert.

Die Bestimmung des Selengehaltes erfolgte nach oxidativem Aufschluß durch die Umsetzung von Selen der Oxidationsstufe +4 mit Diaminonaphthalin, Extraktion in Cyclohexan und fluorimetrischer Quantifizierung des Piazselenols (121). Die absolute Nachweisgrenze unter den verwendeten Analysenbedingungen lag bei 5 ng Selen.

3.2.5. Fettsäureanalyse

Mikrosomenaliquots wurden mit Heptadekansäuremethylester (17:o) als internem Standard versetzt und nach Folch et. al.(124)

in Gegenwart von o.o5 % tert. Butylhydroxytoluol extrahiert. Der Phospholipidgehalt wurde nach Referenz 123 bestimmt.Lipidextrakte wurden in methanolischer Kalilauge verseift und anschließend in Gegenwart von 7 % Bortrifluorid verestert (125).Die entstandenen Fettsäuremethylester wurden in n-Hexan extrahiert,über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und in 1-2 ul Aliquots für die gaschromatographische Analyse eingesetzt.

In Abbildung 2 ist die Trennleistung der Kapillarsäule dokumentiert. Linol- (18:2) und Linolensaeure (18:3) werden auf dieser Säule nicht getrennt.Allerdings tritt Linolensäure nur in geringem Umfang (≦o.5%) in tierischen Geweben auf.

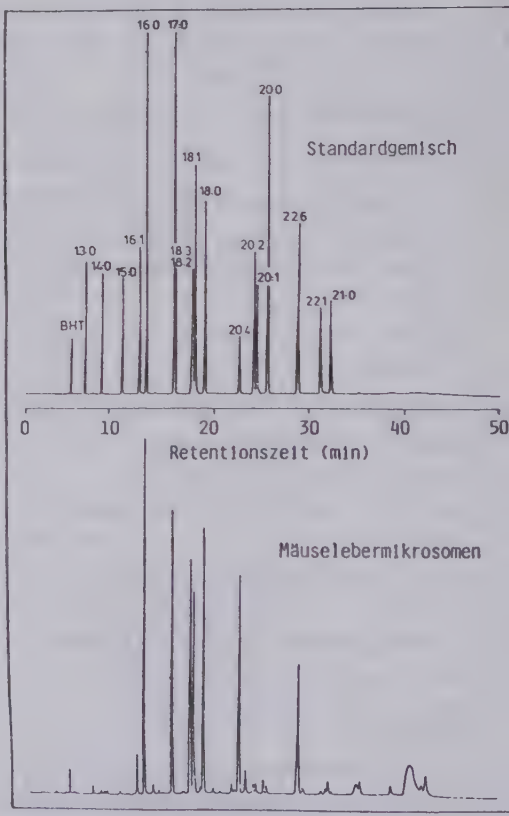

Abbildung 2:Kapillargaschromatographische Trennung von Fettsäuremethylestern

Analysenbedingungen:
Phase: OV 1o1 (25m)
Trägergas:
Wasserstoff o.5 kg/cm^2
Split: ca. 1/1oo
Injektortemperatur: 27o°C
Detektor: FID
Wasserstoff o.7 kg/cm^2
synth. Luft 1.4 kg/cm^2
Temperaturprogramm:

T (°C)	t (min)	T/min
3o	o	39.9
15o	o	2.5
24o	5	

Eine Zuordnung und Quantifizierung der Fettsäuren erfolgte mit Hilfe von Fettsäuremethylesterstandards durch Bestimmung der individuellen Retentionszeiten und Peakhöhen relativ zum internen Standard. Der Gehalt der einzelnen Fettsäuren ist als % des Gesamtfettsäurengehaltes angegeben.

3.2.6. Statistische Bewertung der Versuchsergebnisse

In den Tabellen sind die Ergebnisse als Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen angegeben. Die Größe der zugrunde liegenden Tierkollektive (N) sind im Anhang angegeben.

In den vergleichenden Untersuchungen sind die Enzymaktivitäten der Selenmangeltiere als % der Aktivität von Kontrolltieren gleichen Alters ausgedrückt. Soweit vorhanden, sind zwischen vergleichbaren Gruppen Signifikanzen angegeben, die nach dem Student-t-Test bestimmt wurden. Unterschiede zwischen beiden diätischen Gruppen wurden als signifikant eingestuft, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $P \leq 0.05$ ist.

4. ERGEBNISSE:

4.1. Rahmenbedingungen

4.1.1. Die Bestimmung des Selenstatus der Mäuseleber

Der Versuch, durch die Erzeugung experimenteller Mangel- und Vergiftungszuständen Rückschlüsse auf biologische Funktionen von Selen zu ziehen, setzt eine Analytik voraus,die Auslenkungen aus der Selenhoöostase quantitativ erfassen kann und damit eine eindeutige Charakterisierung abweichender Zustände erlaubt. Zu diesem Zweck stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Die Bestimmung der Selenmenge und die Messung einer selenabhängigen Stoffwechselaktivität - in der Regel der Se-GSH-Px Aktivität - als Maß der bioverfügbaren Selenmenge in einem Gewebe der Wahl.

Beide Methoden haben sowohl technische wie biologische Limitierungen.Der oxidative Aufschluß beinhaltet das Problem des Elementverlusts und von Verunreinigungen. Ferner hat der fluorimetrische Nachweis von Piazselenol eine beschränkte Empfindlichkeit (Nachweisgrenze: 5 ng Selen je Probe).Andererseits ist bei der Verwendung der Glutathionperoxidase Aktivität als Indikator eine Differenzierung zwischen selenabhängiger und selenunabhängiger Glutathionperoxidase (52) essentiell. Bei der Verwendung beider Indikatoren ist zudem zu berücksichtigen , daß die Selenbestimmung nicht zwischen stoffwechselaktivem und -inaktivem Selen unterscheidet, sowie daß Se-GSH-Px nicht das einzige Selenoprotein ist und deshalb auch nicht unter allen Bedingungen einen repräsentativen Indikator darstellt.

Der Zusammenhang beider Meßgrößen unter den diätischen Voraussetzungen dieser Studie ist in Abbildung 3 dargestellt. Über einen weiten Meßbereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Selengehalt der Leber und der cytosolischen Se-GSH-Px Aktivität (Korrelationskoeffizient r^2=0.873). Ist die Se-GSH-Px Aktivität auf einen geringen Minimalwert (11 $\pm$ 5 mU/mg) abgesunken, der wahrscheinlich von unspezifischer GSH und/oder NADPH Oxidation herrührt, so ist noch ein endlicher Selengehalt in der Leber meßbar.Die Extrapolation des Selengehalts der Leber beim Verschwinden der meßbaren Se-GSH-Px Aktivität liefert

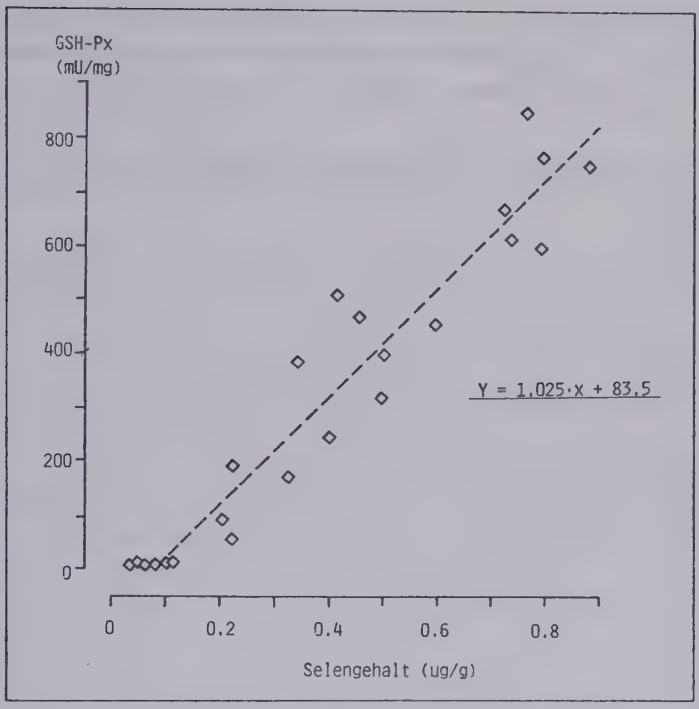

Abbildung 3 : Zusammenhang zwischen dem Selengehalt und der Se-GSH-Px Aktivität der Mäuseleber

einen Wert von 83,5 ng Selen/g Leber. Dieser Selengehalt ist auch nach 6 monatiger Depletion nur in geringem Umfang weiter abgesunken und weist große individuelle Schwankungen auf (60 ± 20 ng Selen/g Leber).

In Anbetracht des großen Arbeitsaufwands bei der Selenbestimmung und der Äquivalenz mit der Se-GSH-Px Aktivitätsbestimmung über einen weiten Meßbereich wurde deshalb für alle weiteren Bestimmungen die Aktivität der Se-GSH-Px als Indikator des Selenstatus verwendet.

4.1.2. Diätetische Voraussetzungen:

Eine weitere Rahmenbedingung für ernährungsphysiologische Studien dieser Art ist die Verwendung von Diäten, die das Element

der Wahl in möglichst geringem Umfang und alle anderen Nahrungsbestandteile in ausreichender Menge enthalten.Beispiele für komplexe Mangelzustände, die einerseits durch den überlagerten Mangel an Vitamin E und schwefelhaltigen Aminosäuren (11) oder andererseits durch die verringerte Bioverfügbarkeit von Nahrungsbestandteilen (14,133) zustandekommen , sind im Falle von Selen bekannt.

Dem wurde durch die Bestimmung des Selengehalts der Basal- (Se^-) Diät und durch die Supplementierung mit Mineralien (94), Vitaminen (95) einschließlich 1oo ppm D,L-x-Tokopherolazetat sowie 3ooo ppm D,L-Methionin Rechnung getragen. Der fluorimetrisch bestimmte Selengehalt der pulverförmigen Basaldiät liegt im Bereich ≤ 1o ppb Selen, während der Selengehalt einer Charge der Altromindiät mit 27 ppb Selen bestimmt wurde.

Zusätzlich wurde die Bioverfügbarkeit kritischer Nahrungsbestandteile durch Metabolit- und Spurenelementbestimmungen in Mäusen untersucht, die für sechs Monate mit der jeweiligen Diät ernährt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt und lassen außer einer 15%igen Retardierung des Körpergewichts und dem drastisch verringerten Selengehalt der Leber auf 8 % des Kontrollwerts im Selenmangel keine signifikanten Unterschiede

	Se^-	Se^+
Körpergewicht (g)	45.6 ± 3.15 [a]	53.0 ± 4.1
Leberprotein (mg/g Feuchtmasse)	164 ± 26	173 ± 30
Glutathion Gehalt (nMol/mg)+	18.2 ± 1.6	19.5 ± 1.5
α-Tokopherol-Gehalt (nMol/mg)+	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.04
Spurenelement-Gehalt (nMol/mg)+		
Kalzium	6.82 ± 1.10	6.75 ± 1.61
Magnesium	41.68 ± 1.77	44.64 ± 3.89
Eisen	4.39 ± 2.95	6.89 ± 2.03
Zink	2.84 ± 0.38	2.79 ± 0.37
Kupfer	0.38 ± 0.12	0.25 ± 0.06
Mangan	0.16 ± 0.05	0.13 ± 0.06
Selen	0.005 ± 0.002 [b]	0.067 ± 0.005

+) bezogen auf mg Leberprotein

a) P = 0.05 ,b) P = 0.001 (N=6)

Tabelle 4: Ernährungsstatus männlicher Albinomäuse beider Gruppen

zwischen beiden diätischen Gruppen erkennen. Allerdings schließt die Anwesenheit vergleichbarer Spurenelementmengen nicht notwendigerweise Umverteilungen in den Metalloproteinen der Mäuseleber im Selenmangel aus.

4.2. Die Abhängigkeit des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber von alimentärem Selen

Der Fremdstoffwechsel der Leber reagiert empfindlich auf eine Fülle von Änderungen im Nahrungsangebot (128) und Selen bildet dabei offenbar keine Ausnahme. Untersuchungen über mögliche antikarzinogene Eigenschaften von Selen bei Anwendung in pharmakologisch-toxischen Dosen beschreiben Stoffwechseländerungen (129-132), wie sie zum Teil auch für den Selenmangel (vergleiche Tabelle 2) bekannt sind. In einem ersten Versuchsabschnitt soll deshalb geklärt werden, welche Änderungen im Fremdstoffwechsel der Mäuseleber unter nicht-adäquaten Ernährungsbedingungen auftreten und in wieweit sie als allgemeiner Ausdruck einer Auslenkung der Selenhomöostase anzusehen sind.

Zu diesem Zweck wurden Tierkollektive für vier Monate mit Diäten unterschiedlichen Selengehalts (1o ppb - 1o ppm Selen) gefüttert, um dadurch ein Spektrum an Selenmangel-,physiologischen Ernährungs- und Vergiftungszuständen in der Maus zu erzeugen.

Die Abhängigkeit der Se-GSH-Px Aktivität der Mäuseleber vom Selengehalt der Nahrung ist in Abbildung 4 dargestellt. In einem Supplementierungsbereich zwischen 5o ppb und 1 ppm Selen besteht ein logarithmischer Zusammenhang zwischen beiden Parametern, wie er auch für die Rattenleber beschrieben ist (56). Eine Sättigung der Se-GSH-Px Aktivität tritt bei ca. 2 ppm Selen im Nahrungsangebot ein. Bei der höchsten Selendosis (1o ppm) lassen sich keine äußerlich sichtbaren Vergiftungssymthome feststellen.

Die Auswirkungen dieses sehr unterschiedlichen Selenangebots auf ausgewählte Aktivitäten des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (o.5 ppm Selen) treten nur im Selenmangel (≤ 1o ppb Selen) und unter Vergiftungsbedingungen (1o ppm Selen) signifikante Änderungen im Fremdstoffwechsel auf.

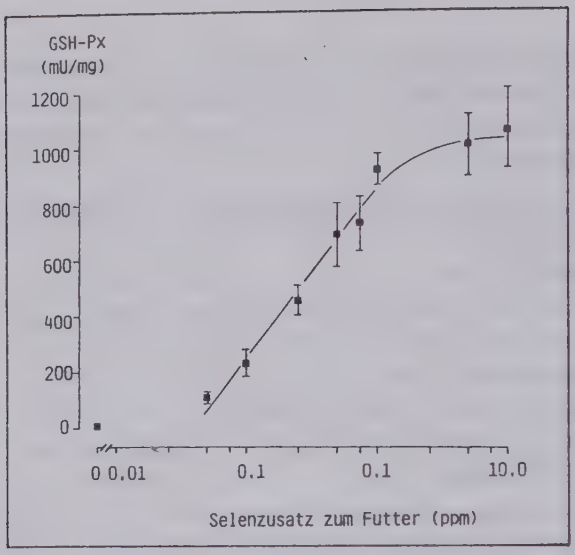

Abbildung 4: Abhängigkeit der Se-GSH-Px Aktivität der Mäuseleber vom Selengehalt der Nahrung

Die Verfütterung toxischer Selenmengen äußert sich in Bezug auf den mikrosomalen Fremdstoffwechsel nur in einer Verringerung des Cytochrom-P45o und -b5 Gehalts um 22 und 27 % der Kontrollwerte. Unter den Cytochrom-P45o abhängigen Reaktionen machen sich jedoch keine signifikanten Aktivitätseinbußen bemerkbar. Unter den Phase II Reaktionen zeichnen sich nur unter den GSH-S-Transferasen Aktivitätsänderungen ab: die Aktivität gegenüber 1.2-Dichloro-4-nitrobenzol ist um 25 % verringert, während die Umsetzung von Ethacrynsäure und die non-Se-GSH-Px Aktivität um 1oo und 18o % erhöht ist.

Diesen relativ kleinen Änderungen im Fremdstoffwechsel bei toxischen Selenkonzentrationen in der Nahrung stehen sehr viel umfangreichere und drastischere Aktivitätsänderungen im Selenmangel gegenüber. In den Selenmangeltieren ist die Glutathionperoxidase Aktivität gegenüber Wasserstoffperoxid - ein Maß für ausschließlich Se-GSH-Px - auf einen unspezifischen Minimalwert abgesunken, der 1.3% der Kontrollaktivität entspricht. Die Differenz der Peroxidase Aktivitäten gegenüber Cumolhydroperoxid und

	Selensupplement in der Diät				
	0 ppm	0.05 ppm	0.5 ppm	5.0 ppm	10.0 ppm
Cytochrom Gehalt:[a]					
Cytochrom P450	0.83 ± 0.12	0.79 ± 0.03	0.76 ± 0.10	0.79 ± 0.21	0.57 ± 0.19$^{\beta}$
Cytochrom b_5	0.35 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.43 ± 0.07	0.41 ± 0.03	0.30 ± 0.09$^{\beta}$
Enzymaktivitäten:					
Äthoxycumarin-O-Deäthylase[b]	4.41 ± 1.37$^{\gamma}$	1.58 ± 0.38	1.31 ± 0.35	1.37 ± 0.12	1.16 ± 0.22
Aminopyrin-N-Demethylase[b]	6.80 ± 1.05$^{\alpha}$	6.41 ± 0.61	7.57 ± 0.70	7.15 ± 0.74	7.87 ± 0.93
Anilin Hydroxylase[b]	0.54 ± 0.14	0.55 ± 0.07	0.57 ± 0.04	0.52 ± 0.16	0.47 ± 0.12
Cytochrom-P450-oxidase[b]	5.10 ± 0.85	4.83 ± 0.72	4.61 ± 0.83	4.81 ± 0.60	5.20 ± 1.21
Cytochrom-P450-peroxidase[b]	109 ± 18 $^{\gamma}$	57.2 ± 9.7	59.3 ± 7.3	53.2 ± 10.3	61.4 ± 12.6
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase[b]	80.7 ± 5.3 $^{\gamma}$	113 ± 5.5	124 ± 23.6	148 ± 17.4	122 ± 12.1
NADH-Cytochrom-c-Reduktase[b]	658 ± 52.6	782 ± 42.9	701 ± 108	837 ± 151	825 ± 130
Flavin-haltige Monooxygenase[b]					
N-Oxid Bildung	2.71 ± 0.42$^{\gamma}$	4.13 ± 0.27	4.40 ± 0.49	4.12 ± 0.38	4.62 ± 0.81
N-Demethylierung	0.88 ± 0.10$^{\gamma}$	1.63 ± 0.32	1.86 ± 0.36	1.68 ± 0.41	1.74 ± 0.29
UDP-Glucuronyltransferase[b]	2.97 ± 0.82$^{\gamma}$	1.12 ± 0.32	1.40 ± 0.21	1.28 ± 0.15	1.52 ± 0.21
Sulfotransferase	0.13 ± 0.03$^{\gamma}$	0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.03
GSH-S-Transferasen					
1.2-Dichloro-4-nitrobenzol[c]	86.0 ± 18.9$^{\gamma}$	28.2 ± 8.7	27.7 ± 9.3	28.3 ± 6.9	22.3 ± 7.7$^{\beta}$
1-Chloro-2.4-dinitrobenzol[d]	3.60 ± 0.31$^{\gamma}$	1.74 ± 0.39	1.46 ± 0.27	1.47 ± 0.06	1.65 ± 0.48
Ethacrynsäure[c]	123 ± 9.7	128 ± 21.7	120 ± 16.2	129 ± 8.7	241 ± 19.3$^{\gamma}$
Selen-haltige GSH-Px[c]	8.76 ± 2.76$^{\gamma}$	113 ± 20.1$^{\gamma}$	691 ± 113	1017 ± 111$^{\gamma}$	1148 ± 149$^{\gamma}$
nicht-Selen-haltige GSH-Px[c]	331 ± 60.5$^{\gamma}$	293 ± 44.6	334 ± 53.3	488 ± 208	949 ± 262$^{\gamma}$
GSSG Reduktase[c]	347 ± 36.5$^{\gamma}$	194 ± 12.9	199 ± 18.5	201 ± 29.5	205 ± 7.1
GSH Thioltransferase[c]	8.8 ± 0.9 $^{\gamma}$	13.9 ± 3.1	14.3 ± 2.1	13.9 ± 1.7	14.5 ± 1.9
Hämoxygenase[b]	0.13 ± 0.04$^{\gamma}$	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02

a) nmol/mg; b) nmol/mg·min; c) mU/mg; d) U/mg

Signifikanz (Student-t-Test): α) $P \leq 0.05$; β) $P \leq 0.01$; γ) $P \leq 0.005$; (N=6)

Tabelle 5: Abhängigkeit des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber vom Selengehalt der Nahrung

Wasserstoffperoxid, ein Maß für non-Se-GSH-Px, ist jedoch unabhängig vom Selenstatus der Mäuse. Ebenso ist der mikrosomale Cytochrom Gehalt in beiden Tiergruppen nicht signifikant verschieden.

Im mikrosomalen Elektronentransport treten jedoch zahlreiche Veränderungen auf: Während die NADH-Cytochrom-c-Reduktase Aktivität vom Selenmangel nahezu unbetroffen bleibt (16% Aktivitätsverlust) ist die Aktivität der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase im Selenmangel um 35 % gegenüber den Kontrollen verringert. Auf der Ebene von Cytochrom-P450 weisen der massive Aktivitätsanstieg der Äthoxycumarin-O-Deäthylase um 240% und der Hydroperoxidase um 84 % sowie der verringerten Umsetzung von Aminopyrin auf Ver-

änderungen im Isoenzymmuster von Cytochrom-P45o im Selenmangel hin. Ebenso ist auch die Flavin-haltige Monooxygenase vom Selenmangel betroffen. Es tritt eine Verringerung der Umsatzraten auf 5o% der Kontrollaktivität ein. Zudem ist der relative Anteil der N-Oxid Bildung gegenüber der N-Demethylierung erhöht. Unter den Konjugationsreaktionen treten ähnlich vielseitige Veränderungen im Selenmangel auf: die Sulfotransferase Aktivität gegenueber 4-Nitrophenol ist auf 56% der Kontrollaktivität erniedrigt, während der Umsatz dieses Substrats durch die UDP-Glukuronyltransferase im Selenmangel verdoppelt ist. Erhöhte Umsatzraten gegenüber 1.2-Dichloro-4-nitrobenzol (31o%) und 1-Chloro-2.4-dinitrobenzol (25o%) deuten ferner auf Isoenzym-Umverteilungen unter den GSH-S-Transferasen im Selenmangel hin. Mit dem Aktivitätsanstieg der Hämoxygenase um 12o % und der GSSG-Reduktase um 74 % sowie dem Abfall der GSH-Thioltransferase Aktivität auf 62 % der Kontrollaktivität sind zudem Enzymaktivitäten vom Selenmangel betroffen,die nicht direkt mit dem Fremdstoffwechsel in Verbinung stehen.

Selenmangel und -vergiftung unterscheiden sich also grundlegend in ihren Auswirkungen. Die Änderungen im Selenmangel sind spezifisch für den Mangelzustand und die Anwesenheit geringer Selenmengen in der Nahrung (5o ppb Selen) ist ausreichend um die Manifestierung dieser Stoffwechseländerungen zu verhindern.

4.3. Der Antioxidansstatus von Selenmangelmäusen

In der Literatur wird häufig versucht Stoffwechseländerungen im Selenmangel als direkte oder indirekte Konsequenz des Verlusts an Se-GSH-Px und damit verstärkter Lipidperoxidation zu erklären.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten von Schutzenzymen gegen reaktive Sauerstoffmetabolite (siehe Tabelle 5) weißt nur die Se-GSH-Px als Schutzmechanismus aus, der im Selenmangel praktisch fehlt. Alle anderen erfaßten Enzymaktivitäten wie non-Se-GSH-Px,Katalase und Superoxiddismutase sind in vergleichbarem Umfang vorhanden. Ebenso sind auch der Vitamin E und Glutathiongehalt der Leber, der lipid- und wasserlösliche Anti-

	Se^-	Se^+
Glutathion Peroxidase (mU/mg)[a]		
Wasserstoffperoxid	9.2 - 7.8 [γ]	733.8 - 93.6
tert. Butylhydroperoxid	27.4 - 3.4 [γ]	816.4 - 85.9
Cumolhydroperoxid	424.5 - 61 [γ]	1176.3 - 162.0
Katalase (mK/mg)[b]	547.4 - 120	530.7 - 174.5
Superoxid Dismutase (pmol/mg)[b]	233 - 29	220 - 32
Gesamtglutathion (nmol/mg)[b]	18.2 - 1.6	19.5 - 1.5
α-Tokopherol (nmol/mg)[b]	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.04

a) Cytosol; b) Homogenat
Signifikanz (Student-t-Test): γ) $P \leq 0.005$ (N=6)

Tabelle 5: Der Antioxidansstatus der Mäuseleber im Selenmangel

oxidansien repräsentiert, im Selenmangel praktisch unverändert.

Zusätzlich wurde das Fettsäuremuster der Mikrosomen von Selenmangel- und selensupplementierten Mäusen untersucht. Ungesaettigte Membranlipide besitzen eine große Anfälligkeit gegenüber peroxidativen Veränderungen und eine daraus resultierende Beeinträchtigung der Membranstruktur könnte eine mögliche Ursache für Änderungen im mikrosomalen Fremdstoffwechsel sein. Wie aus Tabelle 6 zu ersehen ist, ist der Phospholipidgehalt mikro -

	Se^+	Se^-
Phospholipid Gehalt (uMol/mg)	0.44 ± 0.07	0.49 ± 0.12
Fettsäuregehalt		
Palmitinsäure (16:0)	19.83 ± 1.44	20.47 ± 1.96
Palmitoleinsäure (16:1)	1.68 ± 0.12	1.73 ± 0.29
Stearinsäure (18:0)	15.48 ± 1.34	15.06 ± 1.02
Ölsäure (18:1)	14.99 ± 0.92 [b]	13.21 ± 0.63
Linolsäure (8:2)	14.57 ± 0.69 [a]	15.83 ± 1.18
Arachidonsäure (20:4)	13.98 ± 0.59 [c]	18.53 ± 1.10
Dokosahexaensäure (22:6)	17.97 ± 1.99 [b]	15.19 ± 0.56

Angaben als % der Gesamtfettsäuren
Signifikanz (Student-t-Test): a) $P \leq 0.05$, b) $P \leq 0.01$, c) $P \leq 0.005$ (N=6)

Tabelle 6: Fettsäurezusammensetzung mikrosomaler Membranen

somaler Membranen in beiden Gruppen vergleichbar. In der Fettsäurenzusammensetzung dieser Organellen traten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Linol-, Arachidon- und Dokosahexaensäuregehalts auf. In den Lebermikrosomen von Selenmangelmäusen ist der relative Gehalt an Dokosahexaensäure erniedrigt, während der Einbau von Arachidon- und Linolsäure relativ zum Gesamtfettsäuregehalt erhöht ist. Diese Umverteilungen scheinen jedoch eher Ausdruck von Umverteilungen im Fettsäuremuster als das Ergebnis verstärkter Lipidperoxidation - die unspezifisch alle ungesättigten Fettsäuren betreffen sollte - zu sein.

4.4. Der zeitliche Verlauf der Selendepletion

Die Frage nach Se-GSH-Px als Ursache der beobachteten Stoffwechseländerungen schließen jedoch nicht sekundäre Adaptationsprozesse an oxidativen Stress aus,der im Selenmangel erhöht sein könnte.

Zur Klärung dieser Frage wurde der zeitliche Verlauf der Selendepletion untersucht.Männliche Albinomäuse wurden nach der Entwöhnung von den Muttertieren auf die selenarme oder Kontrolldiät gesetzt.Nach definierten Zeiträumen wurde das Körpergewicht der Mäuse gemessen und vergleichende Stoffwechseluntersuchungen zwischen beiden Gruppen durchgeführt. In Abbildung 5 ist die zeitliche Entwicklung der verschiedenen Meßgrößen, die in dieser Longitudinalstudie erfaßt wurden, dargestellt. Ergänzend sind in Tabelle 7 die spezifischen Enzymaktivitäten für drei ausgewählte Zeitpunkte zusammengestellt,um die Signifikanz von Stoffwechseländerungen zu verdeutlichen.

In der Tiergruppe auf der selenarmen Diät sinkt die Se-GSH-Px Aktivität exponentiell mit einer Halbwertszeit von 74 Stunden ab und nähert sich nach 14 Tagen dem Minimalwert an.Während der ersten zehn Tage des Experiments treten jedoch sowohl in den anderen Enzymparametern wie in der Gewichtszunahme zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf.Wenn jedoch Se-GSH-Px auf unter 5 % der Kontrollaktivität abgesunken ist,treten kleine,aber signifikante Aktivitätsanstiege der GSH-S-Transferasen gegenüber 1.2-Dichloro-4-nitrobenzol und 1-Chloro-2.4-dini-

trobenzol, wie auch in der Cytochrom-P45o abhängigen Hydroperoxidase auf 12o % der Kontrollaktivitäten ein. Diese erhöhten Aktivitätsspiegel bleiben zunächst erhalten,bis sich die Se-GSH-Px Aktivität nicht mehr signifikant vom Basalwert unterscheidet.

Gegen Ende der dritten Woche der Selendepletion werden dann komplexe Änderungen in zahlreichen Enzymaktivitäten der Mäuseleber sichtbar. Die Auslenkung des Leberfremdstoffwechsels d.h. eine Erhöhung beziehungsweise Erniedrigung individueller Enzymaktivitäten unter restriktiven Ernährungsbedingungen läuft zeitlich synchron ab: Der Ausgangspunkt für Aktivitätsänderungen der verschiedenen Enzyme extrapoliert auf einen eng begrenzten Zeitraum zwischen dem 17. und 21. Tag der Depletion.Ebenso sind auch die Aktivitätsänderungen der betroffenen Enzyme nach weiteren 3o -4o Tagen auf der selenarmen Diät weitgehend abgeschlossen und entsprechen qualitativ und quantitativ Ergebnissen wie sie bereits in Tabelle 4 vorgestellt wurden.

Das einzige phänotypische Zeichen der Selendepletion im Rahmen dieser Studie, eine leichte Retardierung des Körpergewichts im Vergleich mit Kontrolltieren zeichnet sich nach ungefähr dreimonatiger Dauer der Fütterungsexperimente ab.Nach sechs Monaten ist das Körpergewicht der Selenmangelmäuse signifikant um 15 % gegenüber den Kontrollen erniedrigt,

Zusammenfassend lassen sich drei Phasen der Selendepletion in der Mäuseleber unterscheiden:Der anfängliche schnelle Verlust der Se-GSH-Px Aktivität wird von einer zweiten Phase mit umfassenden Änderungen im Fremdstoffwechsel abgelöst,bevor in einer dritten Phase die Gewichtszunahme der Mäuse beeinträchtigt wird.

4.5. Repletionsstudien

Geht man davon aus,daß diese Änderungen im Fremdstoffwechsel in ursächlichem Zusammenhang mit der starken Beeintraechtigung des nahrungsbedingten Selenangebots d.h. der Verfügbarkeit in suboptimalen Mengen steht,so ist zu fordern,daß diese Auslenkung verschiedener Enzyme des Leberfremdstoffwechsels auf eine Supplementierung mit Selen anspricht. Die Reversibilität der Stoff-

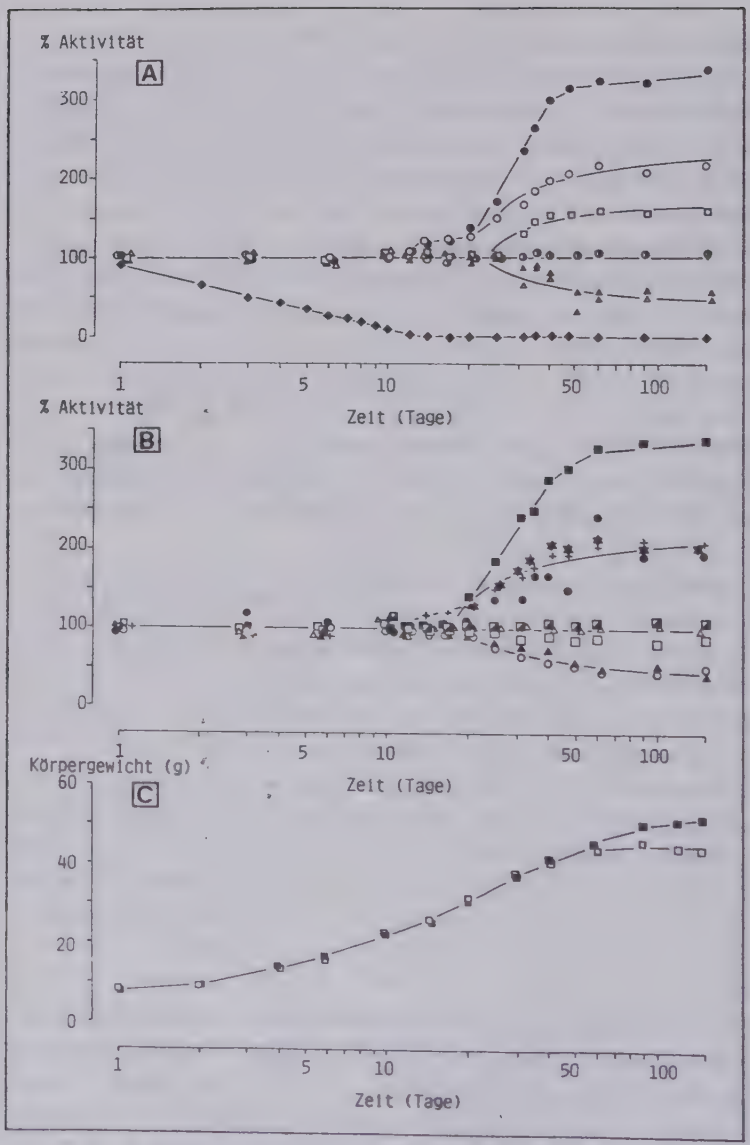

Abbildung 5: Änderungen im Fremdstoffwechsel der Leber und dem Körpergewicht von männlichen Albinomäusen im Verlauf der Selendepletion

Zeichenerklärung zu Abbildung 5:

A)Cytosolische Enzymaktivitäten:GSH-S-Transferasen:(●) 1.2-Dichloro-4-nitrobenzol,(○)1-Chloro-2.4-dinitrobenzol,(◐) Ethacrynsäure,(◆)Se-GSH-Px,(□) GSSG-Reduktase,(▲)GSH-Thioltransferase,(△)Sulfotransferase

B)Mikrosomale Enzymaktivitäten:(■)Äthoxycumarin-O-Deäthylase,(◪)Anilin Hydroxylase,(□)Aminopyrin-N-Demethylase,(+)Cytochrom-P45o-Hydroperoxidase,(▲)NADPH-Cytochrom-c-Reduktase,(△)NADH-Cytochrom-c-Reduktase,(●)Hämoxygenase,(○)Flavin-haltige Monooxygenase,(✱) UDP-Glukuronyltransferase.

C)Körpergewicht: (□)Selenmangel, (■) Kontrolle

Alle Enzymaktivitäten sind als % der Kontrollaktivitäten von Mäusen gleichen Alters angegeben.

Die absoluten Enzymaktivitäten sind für drei ausgewählte Zeitpunkte im Verlaufe der Depletion in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Fütterungsdauer / Enzymaktivitäten	10 Tage		17 Tage		60 Tage	
	Se^-	Se^+	Se^-	Se^+	Se^-	Se^+
GSH Peroxidase (H_2O_2)[b]	60.1±22.9$^\gamma$	753.3±79.8	12.7± 5.3$^\gamma$	685.4±107.4	10.8± 3.7$^\gamma$	815.9±68.3
GSH-S-Transferasen:						
1.2-Dichloro-4-nitrobenzol[b]	21.7± 3.4	20.3±11.2	25.6± 1.6$^\beta$	20.9± 4.8	63.0±19.0$^\gamma$	19.5± 4.9
1-Chloro-2.4-dinitrobenzol[a]	1.86±0.21	1.79±0.25	1.84±0.07$^\alpha$	1.72±0.24	3.34±0.16$^\gamma$	1.53±0.06
Ethacrynsäure [b]	119.8±16.2	123.3± 9.7	132.2±11.4	127.4±19.3	123.6±17.2	132.6± 7.4
GSSG Reduktase [b]	205.3±32.8	214.3±38.0	199.3±18.5	208.5±23.7	374.5±54.7$^\gamma$	233.8±32.8
GSH Thioltransferase [b]	13.4± 3.8	12.4± 3.1	12.1± 4.1	13.2± 1.9	9.4± 3.7$^\gamma$	14.7± 2.9
Sulfotransferase [c]	0.23±0.04	0.26±0.08	0.25±0.06	0.21±0.04	0.16±0.04$^\gamma$	0.26±0.03
Äthoxycumarin-O-Deäthylase [c]	1.5± 0.4	1.4± 0.4	1.5± 0.3	1.5± 0.3	4.3± 0.6$^\gamma$	1.3± 0.3
Aminopyrin-N-Demethylase [c]	7.3± 0.6	6.5± 1.1	7.9± 1.3	8.3± 0.8	7.2± 0.9	7.9± 0.6
Anilin Hydroxylase [c]	0.47±0.08	0.53±0.03	0.51±0.07	0.49±0.09	0.42±0.07	0.50±0.05
Cytochrom-P450-oxidase [c]	4.2± 0.8	4.8± 1.2	5.4± 0.4	5.6± 0.8	5.1± 0.5	4.8± 0.8
Cytochrom-P450-peroxidase [c]	40.3± 8.3	39.1± 3.8	47.3± 6.4$^\alpha$	38.1± 3.3	107.3±12.4$^\gamma$	47.3± 9.8
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase[c]	152.7±21.3	165.3±13.7	148.0±17.4	157.3±30.6	97.4±10.8$^\gamma$	149.7±30.3
NADH-Cytochrom-c-Reduktase[c]	673± 72	692± 42	683± 81	657± 32	684± 42	672± 57
Hämoxygenase[c]	0.07±0.02	0.06±0.03	0.07±0.02	0.06±0.01	0.17±0.05$^\gamma$	0.07±0.03
Flavin-haltige Monooxygenase[c]	3.7± 0.9	3.9± 0.6	4.2± 0.4	4.0± 0.5	2.5± 0.3$^\gamma$	4.4± 0.8
UDP-Glukuronyltransferase[c]	1.7± 0.4	1.7± 0.3	1.6± 0.2	1.4± 0.4	2.6± 0.6$^\gamma$	1.3± 0.4

a) Units/mg;b) mU/mg;c) nmol/mg·min
Signifikanz(Student-t-Test): α) P≤ 0.05,β) P≤ 0.01,γ) P≤ 0.005; (N=6)

Tabelle 7: Der zeitliche Verlauf der Aktivitätsänderungen von Leberenzymen der Maus mit fortschreitender Selendepletion

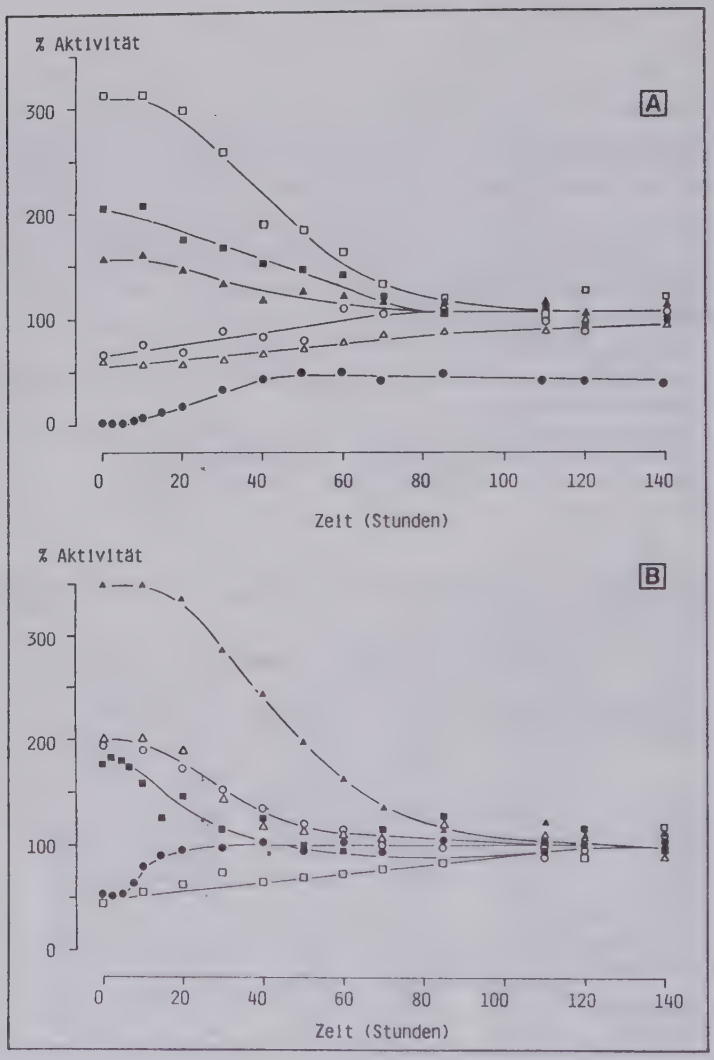

Abbildung 6: Löschung der Selenmangel-induzierten Änderungen im Fremdstoffwechsel der Mäuseleber durch einmalige Selengabe

A)Cytosolische Enzymaktivitäten: GSH-S-Transferasen:(□) 1.2-Dichloro-4-nitrobenzol,(■) 1-Chloro-2.4-dinitrobenzol;(○) GSH-Thioltransferase (▲) GSSG-Reduktase,(●) Se-GSH-Px,(△) Sulfotransferase
B)Mikrosomale Enzymaktivitäten:(▲)Äthoxycumarin-O-Deäthylase,(○)Cytochrom-P45o-Peroxidase,(●)NADPH-Cytochrom-c-Reduktase,(■) Hämoxygenase (□)Flavin-haltige Monooxygenase,(△) UDP-Glukuronyltransferase

Zum Zeitpunkt 0 wurde Selenmangel-Mäusen 25o µg Selen/kg Körpergewicht i.p. verabreicht.Alle Enzymaktivitäten sind als % der Kontrollaktivität ausgedrückt. (N=3)

wechseländerungen im Selenmangel durch die einmalige Gabe von 25o µg Selen je kg Körpergewicht ist in Abbildung 6 dargestellt.

Der Selenpuls führt nach einer Lagphase von ungefähr sechs Stunden zu einem linearen Anstieg der Se-GSH-Px Aktivität der Leber von Selenmangelmäusen.Nach 6o Stunden erreicht die spezifische Aktivität der Se-GSH-Px ihr Maximum,das 45% der Aktivität von selensupplementierten Tieren entspricht. Danach sinkt die Enzymaktivität langsam ab.

Eine reversible Rückkehr der vom Selenmangel betroffenen Enzymaktivitäten zu den Normalwerten tritt in allen Faellen innerhalb 2o-1oo Stunden nach dem Selenpuls ein.Die Zeitkonstanten für diese selenbedingte Aufhebung der Aktivitätsänderungen individueller Leberenzyme von Selenmangelmäusen sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.Bemerkenswert ist dabei, daß die Aktivität der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und der Hämoxygenase schneller als Se-GSH-Px auf den Selenpuls reagiert und innerhalb 12-24 Stunden zu den Kontrollaktivitäten zurückkehrt. Bei allen anderen Enzymaktivitäten findet sich eine 12-24 stündige Lagphase,bevor eine Auslöschung der Stoffwechseländerungen von Selenmangelmäusen eintritt. Führt man den gleichen Versuch mit selensupplementierten Mäusen durch,so ist mit Ausnahme der Se-GSH-Px (24% Aktivitäts - anstieg) keine signifikanten Aktivitätsänderung nach 114 Stunden nachweißbar (Daten nicht gezeigt).

Enzym	$t_{1/2}$ (Stunden)
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	5.7
Äthoxycumarin-O-Deäthylase	23.2
Cytochrom-P45O-peroxidase	21.5
Hämoxygenase	7.5
Flavin-haltige Monooxygenase	42.6
UDP-Glukuronyltransferase	14.1
Sulfotransferase	36.1
GSH-S-Transferasen	
1.2-Dichloro-4-nitrobenzol	21.6
1-Chloro-2.4-dinitrobenzol	43.8
GSSG Reduktase	34.8
GSH Thioltransferase	24.6
GSH Peroxidase	28.8

Tabelle 8: Zeitkonstanten für die Aufhebung von Stoffwechseländerungen im Selenmangel nach einmaliger Selengabe

Zur Abschätzung der für prophylaktische oder kurative Zwecke benötigten Selenmenge wurde an Selenmangelmäusen eine Titration der Selenmangel-spezifischen Aktivitätsänderungen von Leberenzymen mit steigenden Selenpulsdosen durchgeführt. Selenmangelmäusen wurde eine einmalige Selendosis i.p. verabreicht und 114 Stunden später die spezifischen Aktivitäten der Leberenzyme bestimmt.Wie aus Abbildung 7 zu ersehen ist, tritt erst oberhalb einer Schwellendosis von 1o-15 µg Selen/kg Körpergewicht eine meßbare Induktion der Se-GSH-Px Aktivität ein. Diese Dosis ist jedoch völlig ausreichend, um die im Selenmangel erfolgten Änderungen im Leberfremdstoffwechsels aufzuheben. Ein Vergleich der Selendosen zur halbmaximalen Löschung von Änderungen im Fremdstoffwechsel (7 µg Selen/kg) und der halbmaximalen Induktion der Se-GSH-Px Aktivität (25o µg Selen/kg) in der Leber von Selenmangelmäusen weißt damit deutlich zwei Prozesse mit unterschiedlicher Affinität für dieses Element aus.

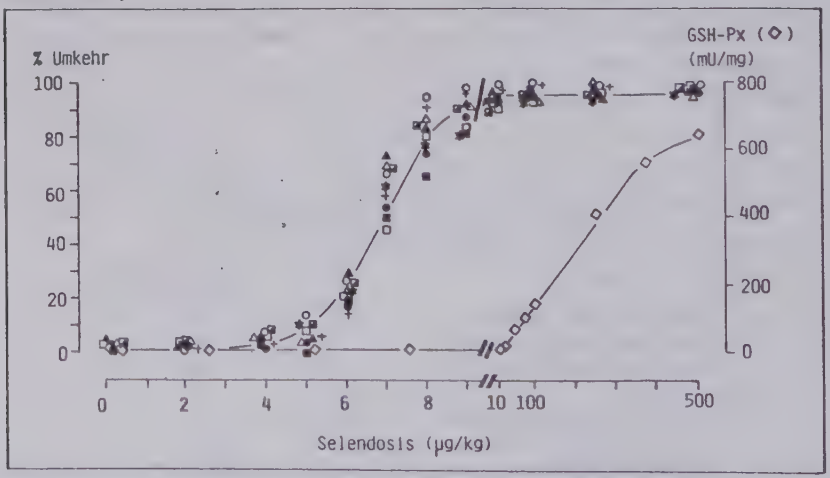

Abbildung 7: Dosisabhängigkeit des Repletionsprozesses und der Se-GSH-Px Induktion in Selenmangelmäusen

Enzymaktivitäten:(○)Äthoxycumarin-O-Deäthylase,(△)NADPH-Cytochrom-c-Reduktase,(+) Flavin-haltige Monooxygenase,(□)Hämoxygenase,(○) GSSG-Reduktase,(△) GSH-Thioltransferase,(■)Sulfotransferase,(◇)Se-GSH-Px; GSH-S-Transferasen:(◪)1.2-Dichloro-4-nitrobenzol,(✱)1-Chloro-2.4-dinitrobenzol.
1oo% Umkehr entspricht einer vollständigen Wiederherstellung der Kontrollaktivität (N=3)

5. DISKUSSION:

In der vorliegenden Studie wurde unter optimalen Versuchsbedingungen ein experimenteller Selenmangel in Mäusen erzeugt und charakterisiert. Im Sinne der Definition von Mertz (134) wurde die Essentialität von Selen für umfassende Änderungen im Fremdstoffwechsel der Mäuseleber durch

- die Erzeugung qualitativ reproduzierbarer Stoffwechseländerungen durch Selenmangel in unabhängigen Fütterungsexperimenten
- dem Nachweis einer festen Sequenz von biochemischen und physiologischen Änderungen mit fortschreitender Selendepletion
- der Reversibilität der im Mangel auftretenden Abnormitäten durch Selengabe

nachgewiesen.

Der Kritik an Untersuchungen von Schwarz (135-137) zur Essentialität der Elemente Chrom, Fluor, Selen, Silicium, Vanadium und Zinn bezüglich nicht-adäquaten Ernährungsbedingungen und dem Einsatz pharmakologisch-wirksamer Spurenelementmengen zu kurativen Zwecken wurde mit der Verfütterung ausgeglichener und optimal zusammengesetzter Diäten Rechnung getragen. Im Rahmen der Untersuchungen ergab sich kein Hinweis auf eine suboptimale Versorgungslage einzelner Nahrungsbestandteile. Mit der Verwendung gerade entwöhnter Jungtiere wurden zudem Depletionsbedingungen gewählt, bei denen der Verlust endogenen Selens mit der Verdünnung der verbleibenden Selenmenge in rasch wachsenden Geweben zusammentrifft.

5.1. Die Charakterisierung des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber

Der Abfall der Se-GSH-Px Aktivität in der Mäuseleber erfolgt in einer frühen Phase der Selendepletion. Änderungen im Fremdstoffwechsel repräsentieren dagegen einen weiter fortgeschrittenen Abschnitt des Selenmangels. Eine Modulation individueller Enzymaktivitäten der Leber scheint jedoch keinen erkennbaren Gesetzmäßigkeiten hinsichtlich der Lokalisierung und funktionellen Wechselwirkungen der erfaßten Enzyme zu gehorchen. Durch Richtung und Umfang ihrer Auslenkung im Selenmangel können allerdings Enzymaktivitäten des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber in

drei Klassen eingeteilt werden:

- eine Reihe von Enzymaktivitäten wie die NADH-Cytochrom-c-Reduktase, die Hydroxylierung von Anilin, die mikrosomale Wasserstoffperoxidbildung, die Konjugation von Ethacrynsäure mit GSH und die non-Se-GSH-Px Aktivität sind unabhängig vom Selenstatus der Mäuse.Die 1o %ige Verringerung der Aminopyrin-N-Demethylierung war in der zweiten Depletionsstudie nicht reproduzierbar und wird deshalb gleichfalls dieser Kategorie zugeordnet.
- eine zweite Gruppe von Enzymen, die die Äthoxycumarin-O-Deäthylase, die Cytochrom-P45o-Hydroperoxidase,die UDP-Glukuronyltransferase und die gegenüber 1.2-Dichloro-4-nitrobenzol und 1-Chloro-2.4-dinitrobenzol reaktiven Isoenzyme der GSH-S-Transferasen umfaßt,weißt im Selenmangel starke Aktivitätsanstiege auf
- demgegenüber treten bei der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, der Flavin-haltigen Monooxygenase, der GSH-Thioltransferase und der Sulfotransferase Aktivitätseinbußen im Selenmangel ein.

Die Signifikanz des Aktivitätsverlusts der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase im Selenmangel für das intakte mikrosomale Elektronentransportsystem ist jedoch fraglich, da stopped-flow Messungen keine nahrungsbedingten Unterschiede in den Reduktionsgeschwindigkeiten von Cytochrom P45o durch NADPH-Cytochrom-P45o-Reduktase aufweisen (138).

Für mehrere Enzyme des Fremdstoffwechsels der Leber (81,82, 84,85), der Lunge (139) und dem Darm (116) von Ratte und Huhn (42) sind qualitativ und quantitativ ähnliche Einflüsse von Selenmangel beschrieben worden. Andererseits findet der Aktivitätsabfall der Cytochrom-P45o-Monooxygenase gegenüber verschiedenen Substraten in der Leber (78) und dem Darm (116) der Ratte sowie der Anstieg der non-Se-GSH-Px Aktivität in der Rattenleber (52) kein Äquivalent in der Selenmangelmaus. Jedoch können diese Gegensätze durch unterschiedliche Isoenzymmuster von Cytochrom P45o (14o) und den GSH-S-Transferasen (141) in beiden Arten erklärt werden.Insgesamt scheinen - soweit abschätzbar - trotz bestehender Spezies- und Organunterschiede Selenmangel in allen Fällen zu ähnlichen Veränderungen im Fremdstoffwechsel zu führen.

Ferner sind auch die Hämoxygenase, GSH-Thioltransferase und

GSSG-Reduktase vom Selenmangel betroffen. Diese Enzyme stehen nicht direkt mit dem Fremdstoffwechsel in Verbindung und es scheint denkbar, daß im Selenmangel umfangreiche Stoffwechseländerungen eintreten, die die Dimensionen des Fremdstoffwechsels weit übersteigen Änderungen im Phospholipid (76), GSH (77) und Vitamin E Turnover (75), dem Glukose Katabolismus (76) und der Modulation der mitochondrialen Substratoxidation (58) stehen im Einklang mit dieser Betrachtungsweise.

5.2. Praktische Konsequenzen

5.2.1. Die Abschätzung der Schwere des Selenmangels

Se-GSH-Px Aktivität und der Selengehalt von Geweben oder Blutbestandteilen sind heute gängige Meßgrößen,um eine Aussage über den Selenstatus von Mensch und Tier zu treffen (148,145). Die Selenbestimmung besitzt dabei gegenüber der Se-GSH-Px Aktivitätsbestimmung ein geringfügig großeres Auflösungsvermögen im Depletionsverlauf. Die Bestimmung eines quantitativen Verlusts von Enzymaktivitäten ist zudem mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

Im Rahmen dieser Studie bietet sich mit einer der im Selenmangel um 100-200 % erhöhten Enzymaktivitäten die Möglichkeit solche Änderungen als biologischen Indikator des Selenmangels einzusetzen.Allerdings ist ein solcher positiver Test auf Selenmangel nur sinnvoll,wenn zuvor der Verlust der Se-GSH-Px Aktivität nachgewiesen wurde.

Zugleich darf die analytische Bedeutung dieses Testprinzips nicht überschätzt werden: Änderungen im Fremdstoffwechsel der Leber durch Selenmangel treten zwar im männlichen, aber nicht oder nur in geringem Umfang im weiblichen Geschlecht von Ratte (78,81,146) und Maus auf. Bei der Übertragung auf andere Spezies muß erst eine geeignete Meßgröße abgeklärt werden.Schließlich kann ein sinnvoller Rückschluß auf Selenmangel anhand von Änderungen im Fremdstoffwechsel nur im Rahmen vergleichender Untersuchungen erfolgen. Die hohe Empfindlichkeit des Fremdstoffwechsels gegenüber Umwelteinflüssen und Nahrungsbestandteilen setzt kontrollierte Rahmenbedingungen voraus, wie sie in der Regel nur

unter Laborverhältnissen gegeben sind.

Bereits geringe Mengen Selen sind ausreichend, um die Selenmangel-induzierten Änderungen im Fremdstoffwechsel, nicht jedoch den Verlust an Se-GSH-Px Aktivität quantitativ aufzuheben (siehe Abbildung 4 und 7).Dies impliziert,daß bei einem Selengehalt kommerzieller selenarmer Diäten von 1o-3o ppb Selen das Ausmaß der Selendepletion leicht von Anfang an limitiert sein kann.Dies ist wahrscheinlich auch einer der Hauptgründe für die Heterogenität der im Selenmangel oder genauer gesagt Se-GSH-Px Mangel beschriebenen Effekte.

5.2.2. Selenmangel-Tiermodelle im Rahmen pharmakologisch-toxikologischer Untersuchungen

Zahlreiche Autoren haben Selenmangel als eine ausschließliche Sonde für Se-GSH-Px und zur Abschätzung von Lipidperoxidation als Schädigungsmechanismus in toxikologischen Studien eingesetzt. Diese Interpretation wird durch geringes Wissen um andere selenabhängige Stoffwechselwege als Se-GSH-Px gefördert .

Trat im Selenmangel wie erwartet eine erhöhte Toxizität von Fremdstoffen ein, so wurde dies meist als ausschließliche Konsequenz des Se-GSH-Px Verlusts diskutiert.Angaben über die Schwere des Selenmangels sind meist auf die Messung der Se-GSH-Px Aktivität und/oder die Angabe der Depletionsdauer begrenzt, die nur eine begrenzte Aussagekraft besitzen. Die Interpretation von Se-GSH-Px als einzigem Determinator einer erhöhten Toxizität gilt nur in einer frühen Phase des Selenmangels.Allerdings sollte diese Voraussetzung experimentell abgesichert sein.

Änderungen im Fremdstoffwechsel durch fortschreitenden Selenmangel - wie sie in dieser Studie in vitro aufgezeigt wurden - können neben dem Se-GSH-Px Mangel zu einem potenten Determinator in in vivo Toxizitätsmodellen werden. Cagen und Gibson (38) finden zwar eine erhöhte Paraquat Toxizität aber auch eine Verlängerung der Hexobarbital-Schlafzeit in Selenmangelmäusen . Burk und Lane (147) weisen einerseits auf eine Diskrepanz im Ausmaß von abgeatmeten Kohlenwasserstoffen, einem Indikator für in vivo Lipidperoxidation, und den durch Fremdstoffe induzierten

Gewebeschäden hin.Andererseits zeigen sie einen relativen Schutz von Ratten im fortgeschrittenen Selenmangel gegenüber Paracetamol und Jodipamid auf und weisen auf den Aktivitätsanstieg der GSH-S-Transferasen als mögliche Ursache hin. Eine beschleunigte Glutathion Absenkung ist in der Leber von Selenmangelmäusen nach in vivo Applikation des GSH-Depletors Phoron nachgewiesen (H.-M. Haney,persönliche Mitteilung).Chen et. al. finden im Huhn (42) eine erhöhte und in der Ratte (43) eine verringerte in vivo Bindung von Aflatoxin B_1 an DNA und RNA sowie einen Anstieg der UDP-Glukuronyltransferase Aktivität in vitro in beiden Arten.

Neben dem Verlust an Se-GSH-Px sollte deshalb eine mögliche Auslenkung des Gleichgewichts zwischen Giftung und Entgiftung individueller Fremdstoffe im Selenmangel überprüft werden.Änderungen im Metabolitenmuster eines Fremdstoffs können, aber müssen nicht im fortgeschrittenen Selenmangel eintreten. Während eine erhöhte Schutzwirkung durch Selenmangel die Existenz anderer Determinatoren zwingend nahelegt , könnte im umgekehrten Fall der defekten Entgiftung durch Se-GSH-Px unter Umständen die erhöhte Aktivierung eines Fremdstoffs oder ein anderer Stoffwechseldefekt überlagert sein.

5.3. Mechanistische Betrachtungen

Die Frage nach dem Sinn dieser Stoffwechseländerungen und den zugrunde liegenden Mechanismen sowie der exakten Rolle von Selen geht über den Rahmen dieser Studie hinaus.Allerdings zeigt sie einige Bedingungen auf,die eine sinnvolle Erklärung des Wirkungsmechanismus von Selen einschliesen sollte. Über den Sinn dieser Stoffwechseländerungen können jedoch im Augenblick nur Vermutungen angestellt werden.Zwischen einer aktiven Antwort der Zelle auf den Selenmangel und einer biochemischen Läsion kann nicht differenziert werden.

Die Änderungen im Fremdstoffwechsel der Mäuseleber im Selenmangel resultieren aus einer Überlagerung von zwei Prozessen. Zwischen beiden kann aufgrund des Zeitpunkts ihrer Manifestation und der Anzahl betroffener Enzymaktivitäten differenziert werden. Geringe Aktivitätsanstiege, die nur die GSH-S-Transferasen und

die Cytochrom-P450-abhängige Hydroperoxidase betreffen, werden bereits im Endstadium des Verlustes der Se-GSH-Px Aktivität ausgelöst.Ihre Ursache ist unbekannt, doch scheint es denkbar, daß diese Änderungen als eine Art Kompensation für den Verlust an Se-GSH-Px fungieren können, zumal alle drei Enzyme gemeinsame Peroxidase Aktivität besitzen.Qualitativ und quantitativ umfangreiche Änderungen im Fremdstoffwechsel - von denen im folgenden die Rede ist - treten erst zu einem späteren Zeitpunkt ein.

5.3.1. Selenmangel und Lipidperoxidation

Viele der dem Selen zugeschriebenen Effekte werden heute auf der Grundlage von Se-GSH-Px und ihrem Schutz gegen peroxidative Schäden diskutiert.

Im Rahmen dieser Studie findet sich jedoch kein Anhaltspunkt auf generell gesteigerte Peroxidationsprozesse im Selenmangel. Der Vitamin E Gehalt der Leber ist praktisch unverändert und auch das mikrosomale Fettsäuremuster läßt keinen Verlust ungesättigter Fettsäuren im Selenmangel erkennen.Dies schließt allerdings nicht aus, daß erhöhte Umsätze einzelner Schutzfaktoren stattfinden.Ebenso könnte die optimale Nährstoffversorgung einen erhöhten Verschleiß von Zellbestandteilen kompensieren.

Von den untersuchten Enzymen in den verschiedenen Zellkompartimenten der Leber sind zwar viele, aber nicht alle Aktivitäten vom Selenmangel betroffen. Der Aktivitätsanstieg individueller Enzyme steht zudem im Widerspruch zu peroxidativen Veränderungen in vitro (142) und in vivo (143). Ebenso finden sich im Vitamin E Mangel-im Gegensatz zum Selenmangel- nur eine teilweise Beeinträchtigung des Fremdstoffwechsels,die auf membrangebundene Enzyme beschränkt ist (R. Reiter, unveröffentlicht). Neben einer direkten Beeinflussung des Fremdstoffwechsels scheint auch die Kontrolle dieser umfangreichen Änderungen durch einen Se-GSH-Px gesteuerten sekundären Regelkreis unwahrscheinlich.Die Auslenkung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und der Hämoxygenase durch den alimentären Selenmangel spricht viel schneller als Se-GSH-Px auf die Repletion an.Neben dieser Diskrepanz im zeitlichen Verlauf spricht auch die Konzentationsabhängig-

keit der Repletion gegen Se-GSH-Px als Steuergröße.

Verstärkte Lipidperoxidation aufgrund des Verlustes von Se-GSH-Px scheint weder eine notwendige, noch hinreichende Voraussetzung für das Zustandekommen dieser Stoffwechseländerungen zu sein. Mit großer Wahrscheinlichkeit steuert vielmehr ein selenspezifischer Prozeß die Aktivitätsänderungen.Dies schließt allerdings keineswegs einen hochspezialisierten Se-GSH-Px Pool aus, der ungefähr 1-2 % des Gesamt-Se-GSH-Px Gehalts der Leber ausmachen und in einem spezifischen Zellkompartiment den Redoxzustand eines Regulationszentrums kontrollieren könnte.Ein Se-GSH-Px Pool mit solchen Eigenschaften wäre naturgemäß schwer meßtechnisch zugänglich und könnte damit leicht übersehen werden.

5.3.2. Stoffwechselregulation durch Selen: Eine Hypothese

Die Kontrolle über die Auslösung dieser komplexen Stoffwechseländerungen obliegt offenbar einem zentralen,endogenen Steuerglied,das eine sehr niedrige Auslöseschwelle für Selen und einen eng-begrenzten Regelbereich besitzt.Dafür sprechen die synchrone Manifestierung der Stoffwechseländerungen mit fortschreitendem Selenmangel, die gemeinsame Konzentrationsabhängigkeit und der schnelle Verlauf der Repletion bei allen erfaßten Enzymparametern. Berücksichtigt man zudem die Vielfalt der vom Selenmangel betroffenen Enzymaktivitäten und die niedrige Schwellendosis zur Löschung dieser Effekte, so muß diesem selenspezifischen Trigger ein beachtlicher Verstärkungsmechanismus nachgeschaltet sein. Selen kann diese Funktion entweder als Bestandteil eines selenhaltigen Regulators oder aber im Rahmen eines selenabhängigen Stoffwechselwegs erfüllen, dessen Ausgangs- oder Endprodukt regulatorische Eigenschaften besitzt.

Zur Modulation von Enzymaktivitäten stehen generell zwei Mechanismen zur Verfügung: die Veränderung der kinetischen Eigenschaften eines Enzyms durch Effektoren und die Änderung der katalytisch-aktiven Enzymmenge durch Manipulation des Protein-Turnovers. Eine Regulation durch Effektoren,die in stöchiometrischer Menge an Enzyme binden,gilt als unwahrscheinlich angesichts der Vielfalt betroffener Enzyme mit unterschiedlichen

funktionellen und strukturellen Eigenschaften. Zumindest der Aktivitätsanstieg der GSH-S-Transferasen gegenüber 1-Chloro-2.4-dinitrobenzol ist mit einem Anstieg der immunopräzipitierbaren GSH-S-Transferase-A/C Isoenzymmenge in der Rattenleber verbunden (R. Reiter, unveröffentlicht).Die Depletions- und Repletionskinetiken sind mit der Beteiligung des Protein Turnovers an der Modulation individueller Enzymaktivitäten vereinbar.Der Depletionsprozeß bewirkt eine langsame, synchrone Auslenkung der Enzymaktivitäten, da unter diesen Bedingungen die Selendepletion wahrscheinlich geschwindigkeitsbestimmend ist. Im Gegensatz dazu wird bei der Repletion eine große Menge Selen schnell in der Leber verfügbar und die Rückkehr der Enzymaktivitäten in ihren Kontrollbereich erfolgt mit der für die individuellen Enzymaktivitäten charakteristischen Zeitkonstanten. Eine Regulation auf der Ebene des Transkriptionsprozesses, des "mRNA processing",der Proteinbiosynthese oder des Abbaus kann die Vielseitigkeit der Stoffwechseländerungen im Selenmangel erklären.

Unterstützung für dieses Regulationskonzept bieten die Befunde von Burk über das Selenoprotein ^{75}Se - P (65), das wahrscheinlich erstmals 1973 als Plasmaselenoprotein (66) beschrieben wurde. In Selenmangelratten baut dieses Protein Submikrogrammdosen Selen selektiv mit höherer Affinität als Se-GSH-Px ein. Zudem kann die Synthese dieses Proteins in vivo durch Cycloheximid (65) und Actinomycin D (68) d.h. sowohl auf der Ebene der Translation wie der Transkription blockiert werden. Damit wird sowohl die Existenz selenabhängiger Stoffwechselaktivitäten in Abwesenheit von Se-GSH-Px sowie der direkte Zugriff des Zellkerns auf Informationen über den Selenstatus und Angebot der Zelle bestätigt.

Ein solcher Regulationsmechanismus kann wahrscheinlich viele Effekte im Selenmangel erklären.Allerdings beschreibt er ebenso wie Se-GSH-Px nur einen Aspekt der biologischen Wirkungen von Selen. Beide Funktionen schließen sich nicht gegenseitig aus. Im Gegenteil, aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zu Selen ist es denkbar, daß Se-GSH-Px neben seiner Schutzfunktion gegen

peroxidative Prozesse diesen hochaffinen Selenpool abpuffern kann. Unter Depletionsbedingungen wirkt Se-GSH-Px dann als ein Selenreservoir, während ein Überangebot an Selen in der Nahrung zum verstärkten Einbau in Se-GSH-Px führt und damit eine Störung des Regelkreises durch überschüssiges Selen verhindert.Das Phänomen der "down regulation" (144),wie es für Hormonrezeptoren beschrieben ist,könnte möglicherweise Ähnlichkeiten in der Auslenkung des GSH- und Hämstoffwechsels und den Aktivitätsanstieg der UDP-Glukuronyltransferase unter Selenvergiftungs- (129-131) und Selenmangeldebingungen(42,77,86) erklären,wenngleich mit Sicherheit auch andere Stoffwechselaspekte berücksichtigt werden müssen.Ein solcher Zusammenhang ist jedoch rein spekulativ und wird unter den vorliegenden Versuchsbedingungen weder bestätigt noch widerlegt.

6. LITERATUR

(1) J.J.Berzelius, Acad.Hand.Stockholm 39 (1818),13

(2) Selenium: Geobotany, biochemistry, toxicity and nutrition, I.Rosenfeld,O.A.Beath eds,Acad. Press,N.Y. 1964

(3) W.O.Robinson, J.Assoc.Official.Agric.Chem. 16 (1933),423

(4) A.A.Nelson,O.G.Fitzhugh,H.O.Calvery, Cancer Res. 3 (1943),23o

(5) J. Pinson, Biochem.J. 57 (1954),1o

(6) K.Schwarz,C.M.Foltz, J.Am.Chem.Soc. 79 (1957),3292

(7) T.A.Noguchi,H.Cantor,M.L.Scott, J.Nutr. 1o3 (1957),15o2

(8) E.L.Patterson,R.Milstrey,E.L.R.Stockstad, Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 95 (1957),617

(9) K.Schwarz, Ann.N.Y.Acad.Sci. 52 (1949),225

(1o) T.Moore, Proc.Nutr.Soc. 21 (1962),179

(11) K.Schwarz, Fed.Proc. 2o (1961),666

(12) L.H.Sprinkler,J.R.Harr,P.M.Newborne,P.D.Whanger,P.H.Weswig, Nutr.Rep.Int. 6 (1971),335

(13) K.E.M.McCoy,R.L.Weswig, J.Nutr. 98 (1969),383

(14) J.N.Thompson,M.L.Scott, J.Nutr. 1oo (1969),797

(15) G.C.Mills, J.Biol.Chem. 229 (1957),189

(16) J.T.Rotruck,A.L.Pope,H.E.Ganther,A.B.Swanson,D.G.Hafeman,W.G. Hoekstra, Science 179 (1973),588

(17) A.B.Kar,R.P.Das, Proc.Natl.Inst. Sci. India B 29 (1963),297

(18) H.E.Ganther,C.Goudie,M.L.Sunde,M.J.Kopecky,P.Wagner,S.H.Oh, W.G.Hoekstra, Science 175 (1972),1122

(19) Y.C.Awasthi,E.Beutler,S.K.Srivastava,J.Biol.Chem. 25o (1975), 5144

(2o) G.N.Schrauzer,D.A.White,C.J.Schneider, Bioinorg.Chem. 7 (1977) 23

(21) D.V.Frost,P.M.Lish, Ann.Rev.Pharmakol. 15 (1975),259

(22) Keshan Disease Group, Chin.Med.J. 92 (1979),477

(23) R.F.Burk,W.N.Pearson,R.P.Wood,F.Viteri, Am.J.Clin.Nutr. 2o (1967),723

(24) National Academy of Science: Medical and biological effects of environmental pollutants:Selenium,NAS,Washington D.C. (1976)

(25) A.M.van Rij,C.D.Thompson,J.M.McKenzie,M.F.Robinson, Am.J.Clin.

Nutr. 32 (1979),2o79
(26) H.G.Enoch,R.L.Lester, J.Biol.Chem. 25o (1975),6693
(27) M.G.N.Hatmanis,T.C.Stadtman, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79 (1982), 4912
(28) G.L.Dilworth, Archs.Biochem.Biophys. 219 (1982),3o
(29) D.C.Turner,T.C.Stadtman, Archs.Biochem.Biophys. 154 (1973), 366
(3o) Free radicals in biology, W.A.Pryor ed.,Acad. Press,N.Y., Band 1-5
(31) L.Flohé,W.A.Günzler,H.H.Stock, FEBS Lett. 32 (1973),132
(32) J.W.Forstrom,J.J.Zakowski,A.L.Tappel, Biochem, 17 (1978),2639
(33) W.A.Günzler,G.J.Steffens,A.Grossmann,S.-H.A.Kim,F.Ötting,A. Wendel,L.Flohé, Hoppe Seylers Z.Physiolog.Chem. (eingereicht)
(34) L.Flohé,G.Loschen,W.A.Günzler,E.Eichele, Hoppe Seylers Z. Physiolog.Chem. 353 (1972),987
(35) G.Cohen,P.Hochstein, Biochem. 2 (1963),142o
(36) L.Flohé in "Free radicals in biology (W.A.Pryor ed.),Acad. Press,N.Y. (1982),Band V,223
(37) C.K.Chow,A.L.Tappel,Lipids 7 (1972),518
(38) S.Z.Cagen,J.E.Gibson, Toxicol.Appl.Pharmacol. 4o (1977),193
(39) S.T.Omaye,K.A.Redy,C.E.Cross,Toxicol.Appl.Pharmacol. 43 (1978), 237
(4o) F.J.Peterson,G.F.Combs jr.,J.L.Holtzman,R.P.Mason, J.Nutr. 112 (1982),1741
(41) D.G.Hafeman,W.G.Hoekstra, J.Nutr. 1o7 (1977),666
(42) J.Chen,M.P.Goethius,G.F.Combs jr.,T.C.Campbell, J.Nutr. 112 (1982),35o
(43) J.Chen,M.P.Goethius,T.C.Campbell,G.F.Combs jr., J.Nutr. 112 (1982),324
(44) A.Wendel,S.Feuerstein, Biochem.Pharmacol. 3o (1981),2513
(45) R.F.Burk,J.M.Lane, Fundament.Appl.Toxicol. (1983)
(46) T.Facchinetti,F.Delani,M.Salmona,M.B. Donati,S.Feuerstein,A. Wendel, Toxicol. Lett. 15 (1983),3o1
(47) R.F.Burk, Biochem.Pharmacol. 31 (1982),6o1
(48) R.F.Burk,M.J.Trumble,R.A.Lawrence, Biochem.Biophys.Acta 618

(198o),35

(49) C.C.Reddy,R.W.Scholz,C.E.Thomas,E.J.Massaro, Life Sci. 31 (1982),571

(5o) F.Ursini,M.Maiorino,M.Valente,L.Ferri,C.Gregolin, Biochem. Biophys. Acta 71o (1982),197

(51) A.Sevenian,S.F.Muakkassah-Kelly,S.Montesstruque, Archs. Biochem Biochem.Biophys. 223 (1983),441

(52) R.A.Lawrence,L.K.Parkhill,R.F.Burk, J.Nutr. 1o8 (1978),981

(53) M.Maiorino,F.Ursini,M.Leonelli,N.Fimato,C.Gregolin, Biochem. Int. 5 (1982),575

(54) G.Perona,G.C.Guidi,A.Piga,R.Cellerino,R.Mena,M.Zatti,Brit. J. Haematol. 39 (1978),399

(55) A.S.Wu,J.E.Oldfield,L.R.Shull,P.F.Cheeke, Biol.Reprod. 2o (1979),793

(56) D.G.Hafeman,R.A.Sunde,W.G.Hoekstra, J.Nutr. 1o4 (1974),58o

(57) W.Lands,R.Lee,W.Smith, Ann.N.Y.Acad.Sci. 18o (1971),1o7

(58) H.Siess,K.M.Moss, Europ.J.Biochem. 84 (1978),377

(59) J.M.May, Archs.Biochem.Biophys. 2o7 (1981),117

(6o) C.K.Chow,K.Reddy,A.L.Tappel, J.Nutr. 1o3 (1973),618

(61) W.Wolters,Dissertation,Berlin(1979)

(62) R.F.Burk,A.M.Mackinnon,F.R.Simon, Biochem.Biophys.Res.Com. 56 (1974),431

(63) A.Wendel in "Enzymatic Basis of detoxication"(W.B.Jacoby ed.) Acad Press,N.Y. 198o,Band I,333

(64) P.D.Whanger,P.H.Weswig,O.H.Muth,J.E.Oldfield, J.Nutr. 1oo (197o),773

(65) R.F.Burk,P.E.Gregory, Archs.Biochem.Biophys. 213 (1982),73

(66) K.R.Millar,N.Z.J.Agric.Res. 15 (1972),547

(67) R.F.Burk, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 143 (1973),61

(68) J.I.Herrman, Biochem.Biophys.Acta 5oo (1977),61

(69) K.P.McConnell,R.M.Burton,T.Kute,P.J.Higgins, Biochem.Biophys. Acta 588 (1979),113

(7o) H.J.Calvin, J.Exp.Zool. 2o4 (1978),445

(71) M.A.Beilstein,M.J.Tripp,P.D.Whanger, J.Inorg.Biochem. 15 (1981), 339

(72) C.K.Banerjee,B.P.Sani, Biochem.Biophys.Res.Com. 1o9 (1982),21o

(73) W.L.McKeehan,W,G.Hamilton,R.G.Ham, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73 (1976),2o23
(74) E.Wallace,G.W.Cooper,H.J.Calvin, Gamete Res. 4 (1983),389
(75) W.C.Fischer,P.D.Whanger, J.Nutr.Sci.Vitaminol. 23 (1977),389
(76) W.C.Fischer,P.D.Whanger, J.Nutr. 1o7 (1977),1493
(77) K.E.Hill,R.F.Burk,J.Biol.Chem. 257 (1982),1o668
(78) L.R.Shull,G.H.Buckmaster,P.R.Cheeke, J.Environ.Pathol.Toxicol. 2 (1979),1127
(79) R.F.Burk,B.S.S.Masters, Archs.Biochem.Biophys. 17o (1975),124
(8o) S.Newman,P.S.Guzelian, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79 (1982),2922
(81) R.F.Burk,R.A.Lawrence,M.A.Correia, Biochem.Pharmacol. 29 (198o) (198o),39
(82) R.F.Burk,M.A.Correia, Biochem.J. 168 (1977),1o5
(83) P.Cikryt,S.Feuerstein,A.Wendel, Biochem.Pharmacol. 31 (1982), 2873
(84) C.C.Reddy,C.E.Thomas,R.W.Scholz,E.J.Massaro, Biochem.Biophys. Res.Com. 1o7 (1982),75
(85) H.E.Ganther, Ann.N.Y.Acad.Sci. 355 (198o),212
(86) M.A.Correia,R.F.Burk, J.Biol.Chem. 253 (1978),62o3
(87) S.M.Pilch,G.F.Combs jr.,Comp.Biochem.Physiol. 69 C (1981),2873
(88) I.D.Capel,M.Jenner,H.M.Dorrell,D.C.Williams, IRCS Med. Sci. 8 (198o),382
(89) J.Parizek,J.Kalouskova,J.Benes,L.Pavlik, Ann.N.Y.Acad.Sci. 355 (198o),347
(9o) H.Iwata,T.Masukawa,H.Kito,M.Hayashi, Biochem.Pharmacol. 3o (1981),3159
(91) R.F.Burk,H.E.Jordan,K.W.Kiker, Tox.Appl.Pharmacol. 4o (1977), 71
(92) R.F.Burk,R.A.Lawrence,J.M.Lane,J.Clin.Invest. 65 (198o),1o24
(93) R.A.Lawrence,R.F.Burk, J.Nutr. 1o8 (1978),211
(94) O.A.Levander,V.C.Morris,D.J.Higgs,R.N.Varma, J.Nutr. 1o3 (1973), 536
(95) R.F.Burk,D.G.Brown,R.J.Seely,C.C.Scaife, J.Nutr. 1o2 (1972), 1o49
(96) I.H.Segel,M.J.Johnson, Anal.Biochem. 5 (1963),33o

(97) T.Omura,R.Sato, J.Biol.Chem. 239 (1964),2379
(98) V.U.Ullrich,B.Weber,Hoppe Seylers Z.Physiolog.Chemie 353 (1972),1171
(99) J.Werringloer,Meths.Enzymol. 52 (1978),297
(1oo) Y.Imai,A.Ho,R.Sato, J.Biochem. 6o (1966),412
(1o1) A.G.Hildebrandt,I.Roots,M.Tjoe,G.Heinemeyer,Meths.Enzymol. 52 (1978),342
(1o2) P.J.O'Brien,A.D.Rahimtula,Meths.Enzymol. 52 (1978),4o7
(1o3) H.W.Strobel,J.D.Digman,Meths.Enzymol. 52 (1978),97
(1o4) K.Mikara,R.Sato,Meths.Enzymol. 52 (1978),1o2
(1o5) D.M.Ziegler,F.H.Pettit, Biochem.Biophys.Res.Com. 15 (1964),188
(1o6) R.Tenhunen,H.S.Marver,R.Schmid, J.Biol.Chem. 244 (1969),6388
(1o7) M.A.Correia,R.Schmid,Biochem.Biophys.Res.Com. 65 (1975),1378
(1o8) J.P.Gorski,C.G.Kasper,J.Biol.Chem. 252 (1977),1336
(1o9) C.E.Mize,R.G.Langdon,J.Biol.Chem. 237 (1962),1589
(11o) K.Axelsson,S.Eriksson,B.Mannervik, Biochem. 17 (1978),2978
(111) W.H.Habig,M.J.Pabst,W.B.Jacoby, J.Biol.Chem. 249 (1974),713o
(112) R.S.Yang,C.F.Wilkinson, Biochem.J. 13o (1972),487
(113) P.Hübl,R.Bretschneider, Hoppe Seylers Z.Physiolog.Chem. 335 (1964),146
(114) H.P.Misra,I.Fridovich,Archs.Biochem.Biophys. 181 (1977),3o8
(115) O.H.Lowry,N.J.Rosenbrough,A.L.Farr,R.J.Randell, J.Biol.Chem. 193 (1951),265
(116) G.A.Pasco,J.Sahai-Wong,E.Soliven,M.A.Correia, Biochem.Pharmacol. 32 (1983),3o27
(117) R.C.Bull,J.E.Oldfield, J.Nutr. 91 (1967),237
(118) T.P. Akerboom,H.Sies, Meths.Enzymol. 77 (1981),373
(119) J.G.Bieri,T.J.Tolliver,G.L.Catignani,Am.J.Clin.Nutr. 32 (1979) 2143
(12o) B.Kerner,Dissertation,Tübingen (1978)
(121) J.H.Watkinson,Anal.Chem. 38 (1966),92
(122) I.P.Clement,Biol.Trace Element Res. 5 (1983),139
(123) C.G.Duck-Chong, Lipids 14 (1979),492
(124) J.Folch,M.Lees,G.H.Sloane-Stanley,J.Biol.Chem. 226 (1964),497
(125) R.M.C.Dawson,N.Hennington,J.B.Davenport, Biochem.J. 84 (1962) 497

(126) C.Mitoma,H.S.Potter,H.C.Reitz,S.Udenfried, Archs.Biochem. Biophys. 61 (1956),431
(127) H.J.Kayden,C.K.Chow,L.K.Bjornson, J.Lipid Res. 14 (1973),533
(128) T.C.Campbell,J.R.Hayes, Pharmacol.Rev. 26 (1974),171
(129) A.H.Daoud,A.C.Griffin, Cancer Lett. 5 (1978),231
(13o) M.D.Maines,A.Kappas, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73 (1976),4428
(131) A.-S.Chung,M.D.Maines, Biochem.Pharmacol. 3o (1981),3217
(132) R.C.Schnell,J.L.Early, Res.Com.Chem.Path.Pharmacol. 32 (1981) 181
(133) S.G.Jenkinson,R.A.Lawrence,R.F.Burk,D.M.Williams, J.Nutr. 112 (1982),197
(134) W.Mertz, Fed.Proc. 29 (197o),1482
(135) K.Schwarz,D.B.Milne,Nature 239 (1972),333
(136) K.Schwarz,J.C.Smith, J. Nutr. 93 (1967),182
(137) K.Schwarz,W.Mertz, Archs.Biochem.Biophys. 85 (1959),292
(138) R.Reiter,A.Wendel, Biochem.Pharmacol. 32 (1983),3o63
(139) S.G.Jenkinson,R.A.Lawrence,R.F.Burk,P.E.Gregory,Tox.Appl. Pharmacol. 68 (1983),399
(14o) R.Kato in "Hepatic cytochrome P45o monooxygenase system" (J.B.Schenkman,D.Kupfer eds.)?Pergamon Press (1982),99
(141) C.Y.Lee,L.Johnson,R.H.Oox,J.D.McKinney,S.M.Lee, J.Biol.Chem. 256 (1981),811o
(142) E.D.Wills, Biochem.J. 113 (1969),333
(143) F.de Matteis in "Hepatic cytochrome P45o monooxygenase system" (J.B.Schenkman,D.Kupfer eds.),Pergamon Press (1982),99
(144) K.J.Catt,J.P.Harwood,G.Aguilera,M.L.Dufan, Nature 28o (1979), 1o9
(145) M.F.Robinson,C.D.Thomson,Nutr.Abstr.Rev. 53 (1983),1
(146) G.Siami,A.R.Schulert,R.A.Neal, J.Nutr. 1o2 (1972),857
(147) R.F.Burk,J.M.Lane, Tox.Appl.Pharmacol. 5o (1979),467
(148) R.F.Burk in "Trace elements in human health and disease"(A.S. Prasad,D.Oberleas eds.),Acad.Press N.Y.(1976),Band II,1o5

LEBENSLAUF:

Ich wurde am 22.7.1956 in Schweinfurt geboren und besuchte dort von 1963-1967 die Volksschule und anschließend das Alexander von Humboldt Gymnasium. Im Juli 1975 legte ich das Abitur ab und immatrikulierte mich im Wintersemester 1975/76 in Tübingen für den Studiengang Biochemie. Das Vordiplom legte ich im Oktober 1977 ab. Nach dem Sommersemester 1978 unterbrach ich für ein Jahr das Biochemie Studium, um an der Johnson-Research-Foundation der University of Pennsylvania in Philadelphia als Forschungsassistent zu arbeiten. Nach der Wiederaufnahme des Studiums in Tübingen legte ich im September 1981 die Diplomprüfung in Biochemie ab. Von Oktober 1981 bis Januar 1984 wurde die vorliegende Dissertation "Modulation des Fremdstoffwechsels der Mäuseleber durch alimentäres Selen" unter Anleitung von Prof. Dr. A. Wendel am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität angefertigt.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren:
M. Arnold, E. Bayer, E. Betz, V. Braun, U. Breyer-Pfaff, B. Chance, U. Feine, F. Gönnenwein, K.G. Grell, E. Lindner, M. Hanack, H. Mauser D. Mecke, H. Metzner, H. Ninnemann, E. Pfaff, H. Pommer, H. Probst H. Remmer, K. Reutter, M. Siess, J. Strähle, G. Weitzel, A. Wendel, U. Weser, H. Zähner.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353